Manual de Técnicas Analíticas en el Laboratorio de Toxicología y Química Forense

Leda Giannuzzi
Doctora en Ciencias Químicas, Catedrática en Toxicología y Química Legal,
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
Investigadora del CONICET.

Luis Alberto Ferrari
Doctor Químico y Lic. En Ciencias Farmacéuticas. Jefe del Laboratorio de Toxicología y Química Legal de la Suprema Corte de Justicia de Buenos Aires.
Catedrático en Química Forense en la Universidad de Morón.

COLABORADORES:

Lic. Miriam G. Arado.

Dr. Darío Andrinolo

Lic.Carlos H. Colángelo
Bioq. Angeles de Cristofano

Lic. Antonio Forte

Bioq. Valentina Garrote

Bioq. Mónica Molinas

Dr. Rodolfo R.Nieto

Bioq. Cristian Oliver

Bioq. Fernando Rainoldi

Bioq. Aníbal Ramos
Dra. Mabel Tomas

Leda Giannuzzi-Luis Alberto Ferrari

I.S.B.N. 987-05-0147-8

Queda hecho el depósito que indica la Ley 11273.

Editorial Praia®

Morón, Buenos Aires, 2006

PRÓLOGO

"Inmensa es la gracia poderosa que reside en
Hierbas, plantas, piedras y sus raras cualidades;
Porque no existe en la tierra nada tan vil, que
no rinda a la tierra algún beneficio especial"

Romeo y Julieta, Act.II, III. W. Shakespeare

Con el espectacular avance en las ciencias básicas que sustentan a la Toxicología, especialmente aquellas relacionadas con los métodos instrumentales cualitativos y cuantitativos de alta performance, nos pareció necesario concebir un libro que incluyera las pruebas utilizadas con mayor asiduidad en un laboratorio toxicológico clínico, forense y/o criminalístico.

Es común en ésta materia que los manuales o compendios a los que estamos habituados consultar omitan o describan con excesiva brevedad los procedimientos analíticos, limitándose a señalar referencias bibliográficas que demandarían tiempo y esfuerzo en adquirirlas e interpretarlas.

En esta contribución hemos puesto mucho énfasis en la descripción detallada de técnicas, paso por paso para la ejecución de las diversas pruebas, que surgen de publicaciones recientes y que, lo más importante, hemos podido mayormente ponerlas en práctica en nuestra labor cotidiana. Con ello, creemos poder aportar al alumnado y colegas que incursionen por esta disciplina nuestra propia experiencia y visión de las técnicas a que haremos referencia.

Algunos capítulos, como drogas de uso indebido en pelo, metales pesados, y restos de deflagración de pólvoras entre otros, contienen introducciones teóricas un tanto extensas, con el objeto que el lector se familiarice con los principios en los que se sustenta la práctica a la que se referirá posteriormente y una mejor lectura de los resultados técnicos. Por otro lado, estos capítulos incluyen metodologías e interpretaciones bastante novedosas por ser de reciente aplicación en nuestro medio.

Hemos intentado brindarles métodos que cumplan un criterio de alto estándar cualitativo en cuanto a sensibilidad, reproducibilidad, confiabilidad, precisión y economía.

Se espera que ésta publicación pueda ser utilizada con fines didácticos y asimismo como guía y libro de consulta para profesionales y estudiantes.

Queremos destacar las contribuciones de nuestros maestros y colegas para enriquecer el manual.

Agradeceremos cualquier crítica o sugerencia que nos permita mejorar la obra.

Leda Giannuzzi y Luis Alberto Ferrari

Octubre de 2006

Índice

Capítulo 1: Aspectos de seguridad en el laboratorio de toxicología.
Autor: Dra. Leda Giannuzzi.

Capítulo 2: Recolección y almacenamiento de las muestras en el laboratorio de toxicología clínica y en el análisis toxicológico forense:
Autor: Dr. Luis A. Ferrari.

Capítulo 3: Toxicología Analítica.
Autores: Bioq. Angeles de Cristofano, Dr. Leda Giannuzzi, Bioq. Cristian Oliver.

Capítulo 4: Tóxicos Volátiles y Gaseosos.
Autores: Dra. Mabel Tomas, Dra. Leda Giannuzzi y Dr. Luis A. Ferrari

Capítulo 5: Abuso de sustancias volátiles
Autor: Bioq.Cristian Oliver.

Capítulo 6: Detección de sustancias no permitidas en caballos de carrera SPC (Sangre Pura de Carrera) y AT (American Troters).
Autores: Bioq. Angeles de Cristofano, Bioq. Aníbal Ramos.

Capítulo 7: Pesticidas
Autor: Bioq.Cristian Oliver.

Capítulo 8: Tóxicos Metálicos.
Autores: Bioq. Fernando Rainoldi, Dra. Leda Giannuzzi, Bioq. Cristian Oliver

Capítulo 9: Estudio de restos de deflagración de pólvoras por métodos químicos e instrumentales.
Autor: Dr. Luis A. Ferrari.
Capítulo 10: Manchas hemáticas.
Autor: Dr. Rodolfo Nieto.

Capítulo 11: Manchas de semen.

Autor: Dr. Rodolfo Nieto.

Capítulo 12: Documentos Cuestionados.

Autor: Bioq. Valentina Garrote, Lic. Antonio Forte.

Capítulo 13: Ficotoxinas.
Autor: Dr. Darío Andrinolo.

Capítulo 14: Micotoxinas.

Autor: Bioq. Mónica Molinas.

Capítulo 15: El pelo como matriz para la búsqueda de Drogas de Uso Indebido.

Autor: Lic. Qca. Miriam Arado.

Capítulo 16: Investigación de Drogas de Abuso y Sustancias de Corte.

Autor: Dr. Luis A. Ferrari

Capítulo 17: Espectrofotometría de Absorción Atómica.

Autor: Lic. Qco. Carlos Colángelo.

Editores: Leda Giannuzzi – Luis A. Ferrari.

La información consignada en cada capítulo es de producción, opinión y responsabilidad de los autores mencionados a continuación del título del capítulo. Los editores no se hacen responsables por el contenido u originalidad de los mismos.

Capítulo 1: Aspectos de seguridad en el laboratorio de toxicología.

Autor: Dra. Leda Giannuzzi.
Profesora Adjunta de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la Universidad Nacional de La Plata.

Introducción.

Los análisis llevados a cabo en un laboratorio de toxicología emplean compuestos químicos de variada toxicidad. El riesgo que implica su manejo no siempre es reconocido por lo operadores. Si bien son numerosas las precauciones que los analistas deben tener en cuenta, como por ejemplo la evaporación de solventes orgánicos sobre baño de agua o plancha calefactora y nunca sobre llama directa, no todos los laboratorios tienen incorporado en su rutina la necesidad de emplear una campana de extracción de gases cuando se trabaja con sustancias corrosivas o solventes volátiles, como el caso mencionado anteriormente o como sucede durante el revelado visual de las placas cromatográficas (TLC).

Otro ejemplo lo constituye la manipulación de ácidos y bases. Se sabe que al preparar soluciones diluidas, estas sustancias deben ser agregadas al agua destilada y nunca en forma inversa. Sin embargo, no siempre se tiene en cuenta la necesidad de almacenar ácidos y bases en lugares separados y nunca en lugares elevados.

Gran parte de las muestras analizadas son de origen biológico. Resulta muy posible que las mismas sean portadoras de agentes infecciosos, particularmente del virus de inmunodeficiencia humana adquirida y de las hepatitis virales B o C. Esto obliga a considerar a todas las muestras como potencialmente peligrosas y a manipularlas con sumo cuidado, desde su obtención hasta su desecho final.

El trabajo en el laboratorio debe realizarse respetando normas e indicaciones que garanticen la integridad y seguridad de las personas y los bienes involucrados en la tarea. Existe excelente bibliografía sobre los aspectos de seguridad en un laboratorio y en particular en uno de toxicología, por lo cual el presente capítulo presenta los problemas mas frecuentes que pueden ocurrir durante el trabajo diario de un laboratorio de toxicología acerca de la manipulación de sustancias químicas, solventes, ácidos, muestras biológicas etc. Este capítulo

pone énfasis en las pautas de trabajo mas seguras que deben aplicarse estrictamente para disminuir los riesgos de accidentes.

1. Precauciones generales.

Todo el personal del laboratorio debe estar adecuadamente entrenado respecto de las normas de seguridad. Todas las instrucciones sobre formas de manipulación y disposición final de las muestras biológicas, solventes orgánicos y otras sustancias peligrosas deben presentarse en forma escrita, en la forma de un manual de procedimientos operativos.

Es fundamental que todo el personal administrativo, técnico y de maestranza del laboratorio, conozca, recuerde, utilice y haga cumplir estas reglas como una forma eficaz de desarrollar una tarea segura para el operador y su entorno.

Las reglas mas importantes en un laboratorio de toxicología se resumen a continuación:

1.1 Pautas generales sobre el cuidado personal.

a) No fumar, comer, beber ni almacenar alimentos o bebidas en el laboratorio.
b) Utilizar guantes descartables (látex o vinílicos) para manejar las muestras biológicas (suero, sangre, orina u otros fluidos biológicos) y sustancias químicas. Lavarse las manos con abundante agua y jabón finalizada la tarea.
c) Utilizar siempre guardapolvo dentro del laboratorio, el que debe sacarse en el momento de retirarse del mismo. No utilizar abrigos sobre este debido a que se elimina su función protectora. No transferir el guardapolvo al hogar dentro de bolsos o mochilas, sino dentro de una bolsa plástica.
d) Utilizar anteojos de seguridad y máscara protectora de nariz y boca para el manipuleo de muestras que puedan producir salpicaduras, material particulado, proyecciones o liberar gases que arrastren el material sólido.
e) Nunca pipetar con la boca. Emplear propipetas o peras de goma para cargar las muestras. Utilizar pipetas automáticas con tips descartables para cargar las muestras.
f) Usar el cabello recogido durante el trabajo dado que puede tener accidentes en caso de estar cerca del fuego. En caso de tener el pelo más largo de los hombros colocarlo dentro del guardapolvo
g) No maquillarse en el laboratorio.
h) Usar calzado apropiado, siempre cerrado (no utilizar sandalias).

1.2 Sobre el laboratorio.

a) Usar campanas de extracción de gases.

b) Descartar siempre las agujas en descartados portátil de paredes impermeables resistente a

c) ador permite retirar la aguja de la jeringa con un simple moviendo evitando tocar la aguja. No debe encapucharse nuevamente las agujas ni retirarlas con la mano.

d) En el caso de emplear la centrifugación, los tubos deben estar cerrados para evitar los riesgos de explosión por ignición del vapor del solvente así como los riesgos asociados con la formación de aerosoles durante la centrifugación de un material que puede ser infeccioso o tóxico. No debe abrirse la centrífuga en movimiento, ni frenarse manualmente; puede cubrirse la tapa con papel absorbente humedecido en desinfectante.

e) Repasar mesadas de trabajo con lavandina 10% recientemente preparada antes y después de finalizada las tareas.

1.2 Precauciones en un laboratorio biológico.

Existen ciertas precauciones básicas que deben observarse en un laboratorio que trabaja con muestras biológicas. Estas se refieren al cuidado que debe tenerse con las muestras respecto a evitar contagios de enfermedades por parte del operador y otras referidas a su descarte. Entre ellas podemos mencionar:

1) Cuidar que todos los recipientes que contienen muestras biológicas sean de materiales resistentes, posean cierre hermético, no presenten pérdidas o salpicaduras y se almacenen en lugares seguros.

2) Todos los elementos (envases, materiales descartables, algodones, papeles absorbentes, jeringas, guantes, etc.) que de alguna manera estuvieron en contacto con muestras biológicas, deben ser descartarse en bolsas rojas. Dichas bolsas una vez completas deben colocarse en una bolsa roja más grande y almacenarlas en lugares seguros, debidamente identificados. La disposición final la lleva debe llevar a cabo una empresa que se encarga de ello.

3) Las muestras biológicas ya procesadas deben descartarse en lavandina.

4) Las muestras de orina ya procesadas pueden eliminarse sin tratamiento previo.

5) Los operadores deben recibir las vacunas de la hepatitis A y B.

Los accidentes en un laboratorio que maneja muestras biológicas inevitablemente ocurren, y a continuación se describen los más frecuentes y las pautas para remediarlo.

1.2.1. Contacto directo o salpicaduras con sangre.

En casos de contaminación directa de piel intacta con muestras de sangre, debe procederse de la siguiente manera:

- lavar con abundante agua y jabón,
- luego, lavar con solución diluida de hipoclorito de sodio.
- En casos de piel no intacta, membranas mucosas, punción con agujas o cortes en general se debe proceder de la siguiente manera:
  - lavar con abundante agua y jabón,
  - lavar con solución de agua oxigenada al 3%,
  - lavar con solución diluida de hipoclorito de sodio.
- Si el ingreso es a través de la boca se debe realizarse buches con abundante solución de agua oxigenada al 3%.
- Si el ingreso es a través de los ojos, lavar con abundante solución fisiológica. Retirar lentes de contacto si los hubiese.

Frente a estos casos debe comunicarse inmediatamente con el centro médico especializado más cercano y notificar el accidente a fin de recibir el tratamiento correspondiente.

1.2.2. Derrames o roturas de envases conteniendo material biológico.

En casos de derrames de líquidos se debe absorber el material mediante el uso de papel absorbente, usando guantes. Para el caso de material biológico, luego lavar toda el área y los elementos utilizados con hipoclorito de sodio (1:10). Luego descartar todos los materiales en bolsas rojas. Todo el procedimiento se realizará empleando guantes, barbijo y ropas protectoras.

1.3 Métodos de descontaminación del material biológico.

1.3.1 Métodos químicos.

Muchos elementos (tubos conteniendo muestras orgánicas, jeringas, etc., deben descontaminarse previo a su descarte. Además debe descontaminar una zona de trabajo diariamente antes y después de iniciar la tarea. Ello se realiza mediante solución de hipoclorito de sodio. Sin embargo, no todos conocen como se prepara correctamente la solución y el tiempo de contacto necesario para lograr su efecto. Se requiere 5 g. de cloro libre por litro de solución para lograr una adecuada desinfección. Estas soluciones deben prepararse diariamente dado que pierden su concentración con el tiempo. Esta solución se logra con las siguientes soluciones de los compuestos en las concentraciones indicadas a continuación:

* Hipoclorito de sodio (5% cloro disponible)	10% (V/V)
* Hipoclorito de calcio (70% cloro disponible)	0,7% (V/V)
* Dicloroisocianato sódico (60% cloro disponible)	0.9% (V/V)
* Cloramina T (25% cloro disponible)	2,0% (p/V)

El tiempo de contacto con el desinfectante depende del material a descontaminar. Las jeringas se descontaminan antes de su descarte con hipoclorito de sodio al 10% en el recipiente para material contaminado durante al menos 30 minutos.

Los tubos con material orgánico o sangre deben sumergirse en hipoclorito de sodio al 10% y dejar en contacto al menos 60 minutos.

1.3.2 Método físico (Esterilización).

La esterilización es el método físico que destruye bacteria, hongos, levaduras y virus en forma completa. A continuación se transcriben las condiciones de esterilización que garantizan la inactivación (muerte) de todos los virus, bacterias y esporas.

- Esterilización por vapor a presión durante 20 minutos a 1 atmósfera y 121º C.

- Esterilización por calor seco durante 2 horas a 170º C.

1.4 Rotura en la centrífuga de tubos con material infeccioso.

La centrífuga debe mantenerse cerrada durante 30 minutos para dejar que los aerosoles decanten. Proteger los ojos con gafas, guantes, barbijo y ropa protectora y cubrir el material derramado con algodón embebido en desinfectante durante 10 minutos en un recipiente para esterilizar en autoclave. Rotor, portatubos o tubos que no puedan esterilizarse en autoclave se sumergirán en un desinfectante apropiado no corrosivo.

1.5 Riesgo asociado al manejo de sustancias químicas en el laboratorio.

Un laboratorio de toxicología debe emplear reactivos de grado analítico. Los niveles máximos de impurezas así como la forma correcta de almacenarlos se encuentran generalmente descriptos en la etiqueta del envase. En la etiqueta figuran las características de reactividad de los productos químicos y también la forma de manejarlos.

Existen normas que establecen los datos de seguridad en el uso del material: Los fabricantes deben proporcionar las llamadas hojas de seguridad del producto químico que en

inglés es MSDS (Material Safety Data Sheets Description) con cualquier producto que se fabrique. La MSDS es un documento técnico que contiene información detallada acerca del producto químico como ser: su número de identificación CAS (Chemical Abstract Service), sinónimo), ingredientes peligrosos, datos físicos, peligros de incendios y explosiones, información de riesgos para la salud, procedimientos para derrames, fugas y desechos, información de protección del personal, precauciones especiales y comentarios.

Las planillas de seguridad de las sustancias químicas pueden ser encontradas en algunas de las páginas de Internet gratuitas, de fácil ingreso y actualizadas describen a continuación:

- Fichas internacionales de seguridad química

http: //www.mtas.es/insht/ipcsnspn/spanish.htm.

- Bases de datos de compuestos químicos

TOXNET Toxicology data network http://toxnet.nlm.nih.gov

- Entidades relacionadas con seguridad química:

http://www.nihs.go.jp/GINC/webguide/csinfo.html

- Emergencias químicasErg2000

http://www.tc.gc.ca/canutec/erg_gmu/erg2000_menu.htm

Existen riesgos muy serios para las personas que trabajan en un laboratorio. Los productos químicos generan importantes peligros potenciales para la salud y presentan diversas categorías como las que se detallan a continuación.

Corrosivos: productos químicos de pH menor a 2 o mayor de 12. Los ácidos y bases se encuentran en esta categoría, provocando la destrucción visible de la piel en caso de contacto. Producen lesiones en el tracto respiratorio por inhalación.

Sustancias tóxicas: venenos, irritantes y asfixiantes. No interactúan directamente con los tejidos pero interfieren en los procesos metabólicos. Penetran al organismo por ingestión, inhalación o absorción cutánea. Entre estos debemos nombrar los compuestos del cianuro que por ingestión o inhalación de ácido cianhídrico provocan intoxicación aguda. Por ello, estos compuestos deben almacenarse bajo llave en el laboratorio y en lugares ventilados.

Carcinógenos: son compuestos que provocan cáncer en animales o seres humanos. Los productos químicos reconocidos como carcinogénicos potenciales o bajo sospecha de provocar

cáncer deben estar claramente etiquetados y deben manejarse en un área específica del laboratorio con equipo protector adecuado. Es posible obtener una lista de los mismos en el National Toxicology Program (NTP) y en la International Agency for Research on Cancer (IARC)

Los productos químicos *mutágenos* y *terátogénicos* ocasionan aberraciones cromosómicas o malformaciones congénitas dado que presentan el potencial para provocar daño irreversible o la muerte de las generaciones futuras.

Los productos *inflamables*y *combustibles*presentan riesgo de incendio. Además muchos de ellos, son peligrosos para la salud. Algunos ejemplos son el xileno, éter etílico, acetona y alcoholes. Existe una diferencia técnica entre los líquidos inflamables y combustibles. Los líquidos inflamables tienen punto de ignición inferior a 60ºC y los líquidos combustibles tienen punto de ignición por encima de 60ºC. El punto de ignición es la temperatura más baja en la que se produce suficiente vapor para formar una mezcla susceptible de ignición en la superficie del líquido. Es necesaria una fuente de calor (una chispa eléctrica, chispa estática, llama) para que el vapor se encienda. El mayor riesgo que presentan los líquidos inflamables o combustibles en el laboratorio es su almacenamiento. Deben almacenarse en zonas alejadas del fuego y en recipientes bien cerrados y con ventilación.

Los reactivos *explosivos*se descomponen con rapidez y producen gases en expansión lo cual origina la explosión. El ácido pícrico en su forma cristalina es explosivo al impacto.

Los compuestos reactivos tienen estructuras moleculares de alta reactividad. Es probable que sean oxidantes con elevado contenido de oxígeno, compuestos con grupos redox, compuestos que reaccionan violentamente con el agua o el aire húmedo, como óxidos de metales anhídridos, compuestos pirofóricos que reacionan espontáneamente con el aire o compuestos que forman peróxidos en determinado tiempo y se tornan explosivos como el éter etílico.

La reactividad de los productos químicos es un concepto relacionado tanto con sus características intrínsecas de peligrosidad como con las de sus condiciones de manipulación. Debe prestarse especial cuidado a las sustancias que presentan reacciones violentas con el agua, tanto por las reacciones exotérmicas que se producen como por desprendimiento de gases o vapores inflamables o tóxicos, ya que ello implica una manipulación, almacenamiento y eliminación diferenciada.

Algunas de las sustancias que reaccionan en forma violenta con el agua son: ácidos fuertes anhidros, alquilmetales y metaloides, amiduros, carburos, flúor, fosfuros, halogenuros de ácido, halogenuros de acilo, halogenuros inorgánicos anhídridos (excepto alcalinos), hidróxidos alcalinos, hidruros, imiduros, metales alcalinos, óxidos alcalinos, peróxidos inorgánicos y siliciuros.

Existen también compuestos que reaccionan violentamente con el aire y pueden generar al cabo del tiempo inflamación espontánea. En algunos casos puede influir también el nivel de la humedad del aire. Algunos ejemplos son alquilmetales y metaloides, arsinas, hidruros, boranos, fosfinas, fósforo blanco, fosfuros, metales finamente divididos, nitruros, xilenos, siliciuro.

Otro aspecto que debe considerarse entre los cuidados en el laboratorio es la incompatibilidad entre reactivos. La incompatibilidad se refiere a sustancias cuya mezcla provoca reacciones exotérmicas pudiendo además emitir gases inflamables o tóxicos. Esto es especialmente importante en el momento de diseñar su almacenamiento.

Las sustancias ácidas pueden producir reacciones peligrosas. Así por ejemplo, la adición de ácidos a efectos de reducir el pH de un medio o simplemente para limpieza, debe realizarse conociendo previamente si existe incompatibilidad entre los componentes del medio y el ácido adicionado. A modo de ejemplo se señalan algunas de reacciones peligrosas de los ácidos:

El ácido clorhídrico en contacto con sulfuros, desprende sulfuro de hidrógeno, con hipoclorito, desprende cloro y con cianuro, desprende cianuro de hidrógeno.

El ácido nítrico en contacto con algunos metales, desprende dióxido de nitrógeno, con ácido fórmico o ácido oxálico desprende, monóxido de carbono y con alcohol etílico, desprende etano.

Muchas sustancias químicas pueden formar peróxidos durante su almacenamiento. Los peróxidos, en ciertos casos, pueden provocar explosiones violentas. Su presencia se puede detectar de una manera muy sencilla mediante la aplicación del test de detección de peróxidos: a 10 ml de la muestra, añadir 1 ml de una solución acuosa al 10% de KI recientemente preparada. Si aparece una coloración amarilla estable, debida a la liberación de yodo, se puede dar por confirmada la presencia de peróxidos. La adición de algunas gotas de ácido favorece la reacción y la sensibilidad puede mejorarse extrayendo la solución acuosa con 1 ml de tetracloruro de carbono y gotas de almidón. El almidón produce un complejo violáceo en la fase orgánica. La falta de coloración debe considerarse como prueba negativa.

Entre los compuestos que suelen producir peróxidos en forma espontánea podemos nombrar: compuestos alílicos, compuestos diénicos, compuestos isopropílicos, compuestos vinilacetilénicos, compuestos vinílicos, cumeno, estireno, tetrahidronaftalenos, éteres, haloalquenos, N-alquilamidas, ureas.

Algunas sustancias químicas presentes en forma de monómeros pueden polimerizarse rápidamente provocando una explosión o rotura de los frascos. Entre estos pueden citarse acetato de vinilo, acroleína, acrilonitrilo, 1,3-butadieno, óxido de etileno, estireno, etc. La polimerización puede tener lugar por simple exposición a la luz, calentamiento, presencia de impurezas ácidas o metálicas, choques, etc. El almacenamiento de monómeros debe realizarse en pequeñas cantidades, conteniendo estabilizadores o inhibidores de polimerización y lejos de productos susceptibles de liberar trazas de ácidos y bases.

Existe la posibilidad que durante el almacenamiento prolongado de productos inestables éstos se descompongan y que en ciertas circunstancias, como choque, calentamiento o desplazamiento simple, puede generar una explosión. Los amiduros alcalinos y ciertas sales de diazonio se pueden incluir dentro de este grupo de productos. El cloruro de aluminio, por otra parte, acumula el ácido formado por descomposición a causa de la humedad absorbida a lo largo del tiempo. Cuando se abre el recipiente, puede ocurrir la rotura del mismo y la proyección de su contenido.

La apertura de un recipiente que ha permanecido largo tiempo cerrado sin usarse es una operación que debe realizarse con precauciones, especialmente, la apertura de frascos esmerilados cuyo tapón haya quedado trabado. Los productos líquidos inestables es recomendable guardarlos en ampollas selladas.

Cada institución debe preparar un plan de emergencia teniendo en cuenta sus áreas de riesgo y contar con procedimientos generales que permitan controlar situaciones irregulares.

En caso de ***quemaduras de tipo químicas*** proceder de la siguiente manera:

- Quitar la ropa de la zona afectada.
- Lavar con abundante agua.
- Pedir ayuda, indicando el nombre de la sustancia que provocó la quemadura.

a) Acidos

-Lavar con abundante agua.

-Neutralizar la acidez de la piel con bicarbonato de sodio durante 20 minutos.

b) Bases

-Lavar con abundante agua.

-Aplicar sobre la zona afectada solución saturada de ácido bórico o acético al 1%

c) Halógenos

-Lavar con hidróxido de amonio al 20%.

-Lavar con abundante agua.

d) Sustancias reductoras

-Aplicar una compresa de permanganato de potasio al 0,1 %.

e) Acido fluorhídrico

-Lavar con abundante agua fría. Prestar atención a la piel debajo de las uñas.

-Colocar compresas de solución saturada de sulfato de magnesio heptahidratada, enfriada con hielo durante por lo menos 30 min.

1.6 Medidas preventivas para llevar a cabo reacciones químicas peligrosas.

Si la reacción que se va a llevar a cabo reviste características de peligrosidad, dado que se trata de una reacción no descrita previamente, existe la posibilidad de la aparición de reacciones secundarias peligrosas. Por ello, debe procederse de manera cuidadosa con la preparación y desarrollo de la misma, tomando las medidas preventivas adecuadas entre las que cabe citar:

- No realizarla nunca sin autorización del responsable del laboratorio y sin recabar información sobre las medidas preventivas a aplicar.
- Emplear las mínimas cantidades posibles de reactivos.
- Emplear procedimientos a escala micro o semimicro disponibles dado que la sensibilidad de los métodos analíticos de separación y confirmación suele ser elevada presentando menor riesgo por el uso de mínimas cantidades.
- Recoger toda la información disponible sobre la reactividad y características de peligrosidad de los reactivos y productos esperados de la misma.
- Disponer del material adecuado y suficiente para su realización, que cumpla los requisitos técnicos necesarios.
- Llevar a cabo la reacción en una vitrina o instalación específica adecuada a los riesgos esperables de aquella.

- Disponer de ropa de trabajo y equipos de protección personal adecuados al riesgo y de los elementos de actuación suficientes (extintores adecuados, mantas ignífugas, neutralizadores, absorbentes, equipos de ventilación y respiración de emergencia, duchas y lavaojos) en relación a los posibles incidentes y accidentes. Avisar al resto del personal del laboratorio de la realización de la reacción.

Bibliografía.

Química analítica cuantitativa.Kolthoff et al. (4ª. Ed.), Nigar, Buenos Aires, 1976.

Self Instruction Sheet for Users of Laboratory Instruments in Intermediate Hospital Laboratories, P.M.G. Broughton, OMS, 1987.

Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies, Food and Drugs Administration, USA, 1987.

Handbook for SRM Users, U.S. Department of Commerce, National Bureau of Standars, 1985.

Quality Assurance in the National Water Quality Laboratory, Canada Center for Inland Waters, Ontario, 1986.

Computer Evaluation of Control Material, P.R. Foulis, Am. Clin, Lab., Marzo 1989.

The Oxford Guide to Calibration Validation of Laboratory Pipettes, J.E. Devine, 1985.

A Quality Assurance Program for Health and Environmental Chemistry, M. Gautier y E. Gladney, Am. Clin. Lab, Julio 1987.

Accuracy in Weighing: Optimizing Technique, R. Hoesly, Am. Lab., Junio 1989.

Dangerous Properties of Industrial Materials (6a. de), N.I. Sax, Van Nostrand Reinhold, New York, 1984.

Hazardous Chemical Information and Disposal Guide, M.A. Armour et al., Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alta T6G 2G2, Canada,1984.

Safety in the Chemical Laboratory, American Chemical Society, Easton PA, 1981.

Toxicology laboratory Hazards, in Hazardous Material Toxicology. Clinical Principles of Environmental Health. Ed. Sullivan, Jr. and Krieger. Willians & Wilkins 1992.

Health Aspects of Chemical Safety – Emergency Response to Chemical Accidents – WHO/IPCS, 1981.

Hospital Preparedness for Chemical Accidents. Young, L Plant Technology and Safety Management Series No. 3, 1990.

Guiding Principles for Chemical Accident. Prevention, Preparedness and Response OECD, Paris 1992.

Accidentes químicos: aspectos relativos a la salud. Guía para la preparación y respuesta. IPCS/PNUMA – OIT – OMS, OCDE. 1998.

Medical Management Guidelines for Acute Chemical Exposures, U.S. Department of Health & Human Services Volume III. San Rafael, ATSDR, 1992.

Capítulo 2.
Recolección y almacenamiento de las muestras en el laboratorio de toxicología clínica y forense.

Autor: Dr. Luis Alberto Ferrari. Catedrático de Toxicología y Química Legal en la Universidad de Morón. Perito Químico Judicial.

Introducción.

En la actualidad, el laboratorio de toxicología se encuentra con un gran número de muestras biológicas conteniendo sustancias en concentraciones al nivel de trazas. La investigación para analitos desconocidos se lleva a cabo mediante la denominada marcha sistemática toxicológica. La adecuada elección, recolección y envío de las muestras es de fundamental importancia ya que la calidad de un resultado nunca puede ser mejor que el de la muestra.

Para la determinación de los diferentes tóxicos suelen emplearse con mayor frecuencia muestras biológicas como orina, sangre, contenido estomacal y vísceras en casos forenses. También el pelo, la saliva y las uñas están siendo hoy en día consideradas como matrices alternativas de gran importancia en el análisis toxicológico.

Para la recolección de la muestra se debe proporcionar instrucciones detalladas a las personas o entidades encargadas, las cuales deben incluir el tipo y la cantidad mínima requerida, tipo y cantidad de conservante que se debe añadir, la forma de etiquetado de los contenedores y las condiciones de empaquetado y transporte.

A continuación se describen los procedimientos necesarios para la toma de muestra destinadas al laboratorio de toxicología clínica y a las destinadas a un laboratorio pericial.

2.1 Recolección y almacenamiento de las muestras en el laboratorio de toxicología clínica.

La toma de muestra para un laboratorio de toxicología clínica es de vital importancia para lograr una adecuada identificación y cuantificación posterior.

El tipo de muestra analizada debe ser identificada con el nombre completo del paciente, el día y hora de recolección así como la naturaleza de la muestra aunque sea evidente. Esto

resulta importante si gran número de pacientes han sido afectados en un accidente o cuando se obtienen varias muestras del mismo paciente. Todas las muestras biológicas deben ser almacenadas a 4 ºC previo al análisis y mantenidas a 4 ºC durante 3 a 4 semanas en el caso en que se requieran futuros análisis. En los casos de implicancias médico legales la muestra a analizar debe ser almacenada a –20ºC hasta que la investigación haya concluido.

La disponibilidad del material biológico es un punto importante a considerar. La elección de la muestra esta estrechamente vinculada con la toxicodinámica del analito buscado. Mediante el conocimiento de su distribución, metabolismo y eliminación se han diseñado técnicas analíticas orientadas a la búsqueda de la droga madre y/o sus metabolitos para su identificación y si fuera necesario, su cuantificación.

Por otra parte, la vinculación entre el caso clínico y el analista es de vital importancia para los resultados del análisis toxicológico. Idealmente esta relación debe comenzar antes que la muestra sea recolectada indicando algún requerimiento especial en algunos casos para la toma de muestra.

Antes de empezar un análisis es importante conocer, en la medida de lo posible, información acerca del paciente (tiempo transcurrido entre la ingestión o exposición al tratamiento médico, la recolección de la muestra, resultados de laboratorio en ensayos clínicos, la sintomatología y las características sociales, ocupacionales y cualquier otro dato que pudiera recabarse, ya que ello condiciona la interpretación de los resultados.

La muestra de orina se encuentra disponible en gran cantidad y generalmente contiene mayor concentración de drogas u otros venenos que la sangre. La presencia de metabolitos puede ayudar a la identificación cuando se emplean técnicas cromatográficas. Para un adulto, se requieren un mínimo de 50 ml de orina que debe ser recolectado en un recipiente sellado, estéril y sin agregado de preservadores. La muestra debe ser tomada tan rápido como sea posible, de preferencia antes del inicio de tratamiento terapéutico. Sin embargo, ciertas drogas tales como los antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina) causan retención urinaria y una toma de muestra muy temprana puede contener cantidades no detectables de droga. Contrariamente, una pequeña cantidad de sustancias tóxicas pueden encontrarse luego de algunas horas o días de producida la intoxicación como en el caso de una intoxicación con paracetamol.

Las muestras de orina también resultan óptimas para la marcha sistemática tendiente a determinar drogas de abuso entre las que se incluyen cocaína, anfetaminas, opiáceos,

barbitúricos, benzodiacepinas. Puede requerirse orina de 24 hs. o una única micción con un mínimo de 50 ml. Para la determinación de psicofármacos (antidepresivos tricíclicos, fenotiazinas, butiferonas, dibenzacepinas, anfetaminas, anticonvulsivantes, opiáceos, barbitúricos y benzodiacepinas) la muestra de elección también es la orina de 24 hs pudiendo también determinarse en una única micción de 50 ml. Para estos últimos casos (drogas de abuso y psicofármacos) las muestras de orina deben ser llevadas lo antes posible al laboratorio pudiendo permanecer hasta un máximo de 5 días en refrigeración.

Para la determinación de marihuana (cuyo principio activo es el tetrahidrocanabinol) en muestras de orina esta debe recolectarse durante 24 hs. y puede ser almacenada durante 15 días en refrigeración y de 4 a 6 meses bajo congelación. También las muestras de orina son excelentes matrices para determinar fenoles requiriéndose orina de 24 horas, siendo su conservación de hasta 6 meses en refrigeración si se agrega ácido acético al 1%.

En el caso de los metales, debido a la eliminación circadiana que presentan muchos de ellos (As, Hg, Cu, Cr, Tl y Pb), se prefiere su estudio en muestras de orina de 24 horas. En general las muestras de orina pueden ser tomadas en recipientes comunes limpios, a excepción de la determinación de plomo (el recipiente que debe ser tratado con ácido nítrico 1:1 durante 24 hs y luego enjuagado escrupulosamente con agua bidestilada para eliminar posibles impurezas). Para la determinación de coproporfirinas totales en orina (indicadores de exposición a plomo) las muestras corresponden a orina de 24 horas que debe ser recolectada en un frasco oscuro conteniendo carbonato de sodio como conservador en cantidad suficiente para una concentración final de 0,1 – 0,5%. Para la determinación de ácido delta amino levulínico (δ-ALA, marcador biológico de exposición al plomo) se requiere orina de 24 de horas recolectada en frasco oscuro conteniendo solución saturada de ácido tartárico aproximadamente 1 ml/ 100 ml de orina. Su conservación debe realizarse en refrigeración por un máximo de 7 días siendo el pH no superior a 10.

Otro tipo de muestras utilizadas en la toxicología clínica son las de sangre. Las muestras de sangre (plasma o suero) son generalmente empleadas para los análisis cuantitativos de algunas sustancias tóxicas como el monóxido de carbono y plomo, siendo un volumen adecuado 10 ml de muestra con heparina. Para la determinación del monóxido de carbono en sangre la muestra puede obtenerse y conservarse en jeringa heparinizada pudiendo mantenerse durante 3 días a temperatura ambiente o en refrigeración. En este caso hemos notado que el análisis mediante cooximetría presenta dificultades por taponamiento del sistema tubular de recolección de sangre entera en muestras con más de 48 horas desde la toma de muestra.

Para el análisis de alcohol (etanol, metanol y otros alcoholes) en sangre, se requiere al menos de 2 ml de sangre en un tubo que contenga oxalato o fluoruro para su conservación pudiendo mantenerse refrigerada durante 15 días. El espacio de aire superior entre la sangre y el tubo (headspace) debe ser mínimo si se debe analizar una muestra en la que se sospecha una intoxicación con monóxido, ácido cianhídrico o si se desea calcular el alcohol en sangre de un individuo.

Las muestras de sangre también pueden ser requeridas para algunos metales como el cadmio, plomo, cromo o litio colectándose en jeringa heparinizada pudiendo conservarse hasta 7 días a temperatura ambiente. La determinación de δ-ALA dehidratasa debe ser realizada en sangre tomada en jeringa heparinizada siendo trasladada rápidamente al laboratorio (no más de 2 o 3 horas). El plomo es un caso particular, debido a que se requiere un conjunto de ensayos conocidos como perfil plúmbico en el cual para la realización del diagnóstico es necesario incluir las determinaciones de plomo en orina, sangre, la enzima delta ala dehidratasa en sangre así como ácido delta aminolevulínico y coproporfirinas en orina obtenida como fue anteriormente descripto.

El monitoreo de drogas terapéuticas se realiza en el suero o plasma debido a que la concentración en la circulación es el parámetro de importancia.

Los plaguicidas organoclorados pueden ser analizados en sangre tomada en jeringa heparinizada en el cual el paciente requiere ayuno no menor de 8 horas, pudiendo las muestras conservarse en refrigeración durante 1 mes o 3 meses en condiciones de congelación. Los pesticidas de tipo organofosforados pueden ser determinados de manera sencilla en forma indirecta mediante la medición de la actividad de las colinesterasas en sangre no hemolizadas.

La determinación de la colinesterasa eritrocitaria o sérica se realiza sobre una muestra de sangre con anticoagulante, plasma o el paquete celular luego de una centrifugación. La muestra de sangre debe ser trasladada al laboratorio dentro de las 6 hs de extraída o bien si es plasma puede ser conservada durante 4 días en refrigeración o 7 días en congelación.

Otro tipo de muestras utilizadas son las de contenido estomacal. Estas pueden incluir vómito, aspirado gástrico o lavado estomacal. Es importante obtener la primera muestra del lavado, mientras que la última puede contener escasa cantidad del tóxico. Se requiere al menos un volumen de 20 ml sin agregado de preservadores para realizar un amplio rango de ensayos. Las muestras de contenido estomacal pueden ser muy variables y requieren procedimientos adicionales como ser filtración y/o centrifugación para realizar los análisis. En general, cuando

ha transcurrido más de una hora de la ingestión esta muestra carece de utilidad debido al vaciado natural del estómago.

Las matrices alternativas como las muestras de cabello han adquirido importancia en los últimos años debido a las ventajas que presentan respecto de las muestras tradicionales de sangre y orina. Entre las ventajas se describe el hecho que las drogas o sus metabolitos permanecen en el pelo un amplio período de tiempo (semanas a meses) respecto de las matrices tradicionales. Por otra parte, las muestras de pelo son estables indefinidamente, presenta una forma simple de recolección, no siendo un método invasivo. El análisis en pelo ha sido aplicado con éxito al análisis de drogas antipsicóticas como haloperidol, en pacientes en hospitales psiquiátricos. No obstante su uso en clínica sigue siendo restringido hasta hoy, dado que pocos fármacos han sido suficientemente estudiados para establecer correlaciones entre concentración en pelo versus dosis administradas.

Una amplia variedad de drogas de abuso (cocaína, opiáceos, anfetaminas, cannabinoles y fenciclidina) han sido determinadas en pelo humano. Además el análisis en pelo permite diferenciar entre una exposición ambiental y el uso activo de las drogas mediante la cuantificación correspondiente. Asimismo, permite también conocer la cronología del consumo analizando diferentes segmentos a diferentes distancias del origen (folículo piloso).

En los últimos años se ha prestado interés al estudio de ciertas drogas en muestras de uñas debido a su similitud con las muestras de pelo ya que muchos tóxicos suelen acumularse en dichas matrices. Se ha estudiado las uñas como matriz para la para investigación de drogas de abuso durante períodos prolongados así como en los exámenes forenses. Las drogas principalmente estudiadas han sido metanfetaminas y cocaína.

Recientemente se ha informado sobre la detección de algunas drogas de abuso y psicotrópicos en médula ósea y ciertos huesos, como los de la cresta ilíaca. Inclusive se ha detectado cocaetileno, especie química indubitable del consumo conjunto de cocaína y etanol.

Por último, también otros fluidos biológicos han concentrado el interés forense como la saliva, sudor, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico pero su empleo como material para la extracción de drogas se encuentra en etapas de desarrollo.

La cadena de custodia debe empezar en el momento de la toma de muestra. La cadena de custodia incluye a los procedimientos que deben quedar por escrito en la documentación

referidos a cualquier manipulación o transporte de la muestra desde un individuo o lugar a otro, así como intentar minimizar en lo posible el número de personas que manipulen la muestra.

En capítulos adjuntos se analiza con detalle la toma de muestra y su conservación para cada grupo de tóxicos que se presentan en un laboratorio de toxicología así como para muestras vinculadas con la toxicología legal.

2.2 Toma y remisión de Muestras en el Análisis Toxicológico Forense.

La adecuada selección, recolección, preservación y envío de especimenes biológicos y cualquier otra muestra con el propósito de una investigación toxicológica forense es sumamente importante. El éxito de un estudio analítico y su interpretación dependen en gran parte de esta etapa.

Es cierto que no todo estudio analítico toxicológico en la esfera clínica debe concluir necesariamente en el ámbito forense. No obstante los casos de resonancia pública acaecidos en las dos últimas décadas nos han enseñado a movernos con prudencia en este sentido. Es decir, la posibilidad que estos estudios terminen debatiéndose en un estrado judicial.

Cada laboratorio debe dar instrucciones precisas sobre el tipo de matriz que debe recolectarse y su cantidad mínima necesaria (según la metodología que aplicará) que contemple una muestra adicional para repetición del análisis, si este fuera requerido con posterioridad.

La información básica que debe consignarse para casos de análisis post-mortem incluye un informe de autopsia minucioso, indicando los mínimos detalles de la observación macroscópica.

-Historia Clínica (especialmente en casos mala praxis).
-Drogas que se piensa o se sabe que consumía el individuo antes de morir.
-Profesión ó actividad laboral que desarrollaba.
-Síntomas ó conducta que presentaba el individuo antes de fallecer.

Debe remitirse también todo efecto que se estime pudo estar relacionado con el deceso de la víctima, como ropas contaminadas u objetos encontrados en el lugar del hecho.

En caso de individuos vivos, consignar todo dato aportado por el mismo paciente o familiares, tipo de tareas que desarrolla, hábitos alimentarios, etc. El profesional médico debería expresar sus sospechas, aunque no las considere relevantes. Téngase en cuenta que el analista se vale mucho de esas observaciones para poner énfasis en la búsqueda de una o varias sustancias y sus congéneres. Más aún, cuando no se tiene una orientación bien definida al respecto.

En el ámbito legal, las muestras remitidas pueden ser divididas en diferentes áreas según sea el estudio posterior que se llevará a cabo:

1) análisis toxicológicos,
2) estudios inmunohematológicos,
3) análisis anátomo-patológicos y
4) estudios en química ambiental.

A continuación se describen las muestras con énfasis en el modo de recolección y almacenamiento de los materiales biológicos.

2. 3 Análisis toxicológico forense.

Para la realización de los estudios toxicológicos forense, el tipo de muestras habitualmente remitidas en caso de individuos fallecidos puede ser: sangre, orina, vísceras, pulmón, corazón, cerebro, tráquea, hígado, riñón, bazo, tejido adiposo (grasa), pelo (pericraneal, púbico, axilar), uñas, humor vítreo, bilis.

Es importante que el profesional que intervenga en la toma de muestra seleccione aquéllas que, según la anamnesis, ofrezcan mayor posibilidad de detectar el compuesto que se presuma involucrado en el caso.

El tipo de muestras que puede obtenerse en individuos vivos incluye sangre o suero, orina, vómito o aspirado gástrico, pelos, uñas, saliva. La selección de algunas de estas matrices queda supeditada a la disponibilidad de las mismas o bien al tipo de tóxico sospechado y sus características farmacocinéticas.

A continuación se describe la forma que consideramos correcta de remitir el material biológico para estudio.

2.3.1 Vísceras.

Deben colocarse en recipientes rigurosamente limpios, sin agregado de ningún tipo de sustancia con fines de preservación ú otro motivo, especialmente formol. Si pudiera disponerse de un recipiente para cada órgano sería ideal, pero se acepta en la práctica colocarlos de la siguiente manera: recipiente I para cerebro, recipiente II para hígado, riñón y bazo, recipiente III para pulmón y corazón, y recipiente IV para estómago y su contenido.

Dichos recipientes pueden ser de vidrio incoloro, pero sería más apropiado disponer de frascos de vidrio color caramelo, especialmente para sustancias fotosensibles. El cierre debe ser hermético. Si no es posible debe sellarse con parafina. Evitar tapas de papel o cartón. Pueden utilizarse recipientes plásticos con tapas del mismo material que permitan un cierre hermético.

El lacrado excesivo de los recipientes conteniendo líquidos debe evitarse debido a que durante las maniobras de apertura resulta común la caída del lacre dentro del líquido, contaminando los extractos.

Los frascos mencionados deben colocarse dentro de bolsas plásticas capaces de cerrarse herméticamente por algún medio, por ejemplo el calor. Actualmente se encuentran disponibles bolsas plásticas de distintos tamaños con un tipo de cierre inviolable. Ello indica que en el caso de pretender abrir los recipientes ya cerrados, se destruye el soporte permitiendo de este modo detectar las maniobras dolosas de apertura.

Una vez embaladas, deben rotularse correctamente con iniciales o numeraciones internas del laboratorio que no den lugar a confusión, utilizando tinta firme resistentes a soluciones acuosas. Es conveniente colocar las bolsas en recipientes apropiados (por ejemplo cajas de cartón resistentes) asegurando que los recipientes contenidos no puedan sufrir roturas durante el traslado al laboratorio.

Las muestras deben colocarse finalmente en refrigerador a 4°C. La temperatura ideal es –20ºC, donde la actividad enzimática en los sistemas biológicos se halla prácticamente paralizada. Sin embargo, debe recordarse que la congelación produce expansión del volumen de líquidos y tejidos, produciendo la rotura de envases de vidrio. En general se debe respetar un volumen libre de al menos un tercio para dar lugar a la expansión del material. Estudios de degradación de analitos mostraron que a estas temperaturas los tejidos y humores biológicos sufren poca pérdida de los mismos por biotransformación. Sin embargo debe considerarse a cada analito como particular en al ámbito biológico donde se halla.

Es necesario enviar la muestra lo antes posible al laboratorio, evitando interrumpir la cadena de frío durante el traslado. Si deben recorrerse grandes distancias, pueden utilizarse recipientes de telgopor con hielo en su interior o bien utilizar bidones refrigerantes, evitando el contacto directo de los mismos con las muestras.

2.3.2 Sangre.

Los recipientes para enviar muestras de sangre pueden ser frascos, preferiblemente pequeños, con su respectiva tapa para lograr cierre hermético ó bien tubos de ensayo con cierre perfecto. Debería agregarse en la mayoría de los casos, fluoruro de sodio como preservador, aunque si es refrigerada y llevada rápidamente al laboratorio no es imprescindible. Se necesitan como mínimo 10 ml para someter este fluido a estudio toxicológico general y 2 ml para estudio de alcoholemia (esto si se cuenta con cromatógrafo gaseoso ó se aplica la técnica de microdifusión).

Cuando se envasa sangre ó suero, no debe quedar espacio vacío en el recipiente, es decir se debe evitar cámara de aire, que produce pérdidas importantes no sólo de etanol sino de cualquier otro tóxico volátil. Para evitar esto, debe llenarse al ras, cubrir con tapa en forma correctamente ajustada *y* si es posible, sellarse con precinto de aluminio (como los viales de medicamentos inyectables).

Un procedimiento correcto en la toma de muestra consiste en no enjuagar con alcohol los recipientes que se propone utilizar para colocar las muestras de sangre ó suero. Tampoco debe utilizarse este solvente para desinfectar la piel del individuo al que se extrae muestra hemática para análisis de alcoholemia.

Es recomendable no solicitar frascos pequeños en Hospitales ó Unidades Sanitarias debido a que muchas veces quedan restos de medicamentos que no se extraen con lavado “casero”, provocando confusiones en el ulterior estudio analítico. En los casos de extracciones a imputados de un ilícito, se recomienda la extracción de por lo menos dos muestras sanguíneas consecutivas, con un intervalo de una hora entre ambas extracciones. Debe anotarse la hora y rotularse claramente (esto resulta importante para determinación de alcoholemia retrospectiva).

2.3.3 Orina.

La toma de muestra de orina se realiza en forma similar a la recolección sanguínea, obviamente colocada en recipientes de mayor capacidad. Debe enviarse como mínimo 10 ml, pero es conveniente remitir toda la existente en vejiga en casos post-mortem o la emitida por individuo vivo, durante 24 hs. Se debe rotular y cerrar perfectamente. Debe indicarse mes, día y hora de emisión ó recolección y fecha y hora de una dada circunstancia por la que se le pide la determinación (determinación de cocaína o metabolitos). No debe agregarse ninguna sustancia como conservante y debe refrigerarse a 4°C.

2.3.4 Pelo.

Para la recolección de las muestras pilosas debe cortarse en sector occipital (coronilla) bien al ras del cuero cabelludo, en lo posible 1 ó 2 grs. (en la práctica un puñado o mechón es suficiente). Tomar el extremo cercano al cuero cabelludo y colocarlo sobre el papel ó cartón para luego abrochar con aplique de broches de tamaño apropiado y colocar otro papel o cartón encima del anterior. Luego, pegar o atar según corresponda siendo aconsejable resguardarlo de la luz en papel de aluminio. El envoltorio debe permanecer firme y debe indicarse claramente la zona cercana al cuero cabelludo y la distal.

Para el caso de requerir determinación de drogas en vello pubiano y axilar, este debe ser cortado al ras de la piel y colocarlo en sobre de papel común. Si la muestra se toma de un individuo fallecido es aconsejable arrancar el pelo para obtener el bulbo piloso mejorando las posibilidades de detección retrospectiva de ingesta.

2.3.5 Restos óseos.

Para realizar las determinaciones toxicológicas en restos óseos, las muestras deben remitirse en cajas ó bolsas de cartón cerradas. Si las piezas óseas halladas estuvieran húmedas, se deben dejar secar a la sombra y recién luego enviarlas en sobres de papel cerrados.

Generalmente se utilizan huesos procedentes de la cresta ilìaca o bien huesos largos como femur.

Investigaciones muy recientes han mostrado la importancia de este tejido en casos postmortem (McGrath & Jenkins, 2004). Inclusive ciertas drogas que no fueron halladas en

sangre fueron detectadas en hueso (nortramadol, quinina, cocaetileno, además de otros psicotrópicos).

2.3.6 Prendas para la investigación de pólvora.

Tanto los residuos como las partículas de pólvora parcialmente quemadas, se depositarán sobre una superficie en una disposición definida, dependiendo de la distancia que existe entre el blanco y la boca del cañón. Cuando se trata de disparos de contacto deberán examinarse todas las ropas que se hallan en el camino del proyectil.

Existen numerosos factores que afectan la retención de residuos sobre la prenda de modo que el valor de prueba queda condicionado al seguimiento estricto de los pasos detallados en el instructivo:

1. Las prendas de la víctima deben ser retiradas en forma lenta y por sectores. De no ser posible, se sugiere cortar las mismas por zonas que no comprometan orificios y/o desgarros que han de ser fundamentales para el análisis.
2. Si existieran manchas de sangre húmeda deben secarse al aire ó con corriente tibia de aire y flujo débil.
3. Las prendas deben colocarse una por una, en forma separada, entre dos planchas de cartón perfectamente dispuestas, atadas con hilo, evitando roces ó corrimientos, principalmente en las zonas donde hay presunción de existencia de residuos de fulminante ó esquirlas de bala. Resulta importante asegurar el área a analizar.

2.3.7. Estudios inmunohematológicos.

La toma de muestra para estudios inmunohematológicos tiene como objetivo la identificación en cadáveres y/o individuos, de manchas de sangre y manchas de semen.

La recolección de muestras para la identificación de cadáveres y/o individuos puede obtenerse en distintas circunstancias. Una de las posibilidades puede ser mediante el procedimiento de autopsia (cadáveres), obteniendo una muestra sanguínea de aproximadamente 15 ml por punción intracardíaca directa, utilizando aguja y jeringa descartables (estériles y secas). Luego se envasa la muestra en tubo cónico, con tapa a rosca, con sus respectivos rótulos y demás garantías de ley y se mantiene refrigerada entre 4 y 6ºC (no debe congelarse). En aquellos casos en los cuales sobre la misma muestra se solicita la determinación de alcoholemia, el anticoagulante a emplear debe ser el fluoruro de sodio en una

concentración de 15 mg/ml, debiéndose observar la misma norma que para el caso anterior y conservarla entre 4 - 6ºC.

2.3.8 Recolección de muestras para la identificación de manchas biológicas.

Un hecho fundamental en el análisis de este tipo de muestras lo constituye el proceso de obtención y su posterior conservación. Una inadecuada recolección y/o mala preservación puede alterar este tipo de evidencias, a tal punto que no sólo dificultarían sino que directamente imposibilitarían este tipo de pericias ya que los elementos a evaluar son en general sumamente lábiles.

2.3.9 Manchas de sangre.

En un principio, estas manchas poseen un color rojo brillante que paulatinamente cambiará a una tonalidad pardo-rojiza. Para su levantamiento, un elemento a tener en cuenta es el tipo de superficie sobre la cual se encuentra asentada.

Si el soporte no es absorbente, luego de una minuciosa descripción de la distribución, posición y forma de las manchas (es de suma utilidad la obtención de fotografías), se puede proceder a poner en contacto la mancha con una gasa apenas húmeda en solución fisiológica, trasladándola posteriormente a un tubo cónico con tapa a rosca especialmente si la cantidad es escasa ó eventualmente, a una cápsula de Petri, descartable. A continuación y en un lugar adecuado, se dejará secar la gasa, pudiendo usarse un secador de cabello con aire frío. Luego el material será rotulado, lacrado e individualizado de modo tal que pueda identificarse claramente de dónde fue obtenida cada una de las muestras y cumpla con las garantías. Debe conservarse seco en lugar refrigerado.

Si la superficie es absorbente, por ejemplo una alfombra, cortinas, colchones, etc, se evaluará la conveniencia de proceder a cortar la mancha o bien el envío del material en cuestión al laboratorio, siempre respetando, de ser necesario, las condiciones de secado previamente citadas.

Si las manchas están asentadas sobre prendas, las mismas se dejarán secar en iguales condiciones a las ya expuestas, extendiéndola sobre bastidores ó superficies adecuadas, evitando el doblado, ya que podrían mancharse zonas que, en un principio, no lo estaban,

alterando así la evidencia original. Una vez seco, se debe envolver por separado, prenda por prenda, en papel madera y proceder a continuación conforme a las garantías de ley.

Finalmente, cuando se trata de sangre no coagulada se pueden seguir dos procedimientos. El primero de ellos consiste en tomar con una pipeta Pasteur ó bien con una jeringa, un volumen determinado de sangre (3 ml) y colocarlos en un tubo de ensayo ó frasco conteniendo igual cantidad de solución fisiológica. La segunda posibilidad consiste en colocar una tela de algodón o papel de filtro de modo tal que absorba dicho fluido el cual sería secado a continuación según las condiciones ya descriptas. En ésta operación el elemento absorbente será sostenido con pinzas adecuadas para tal fin. Finalizadas las operaciones enunciadas precedentemente, se procederá a rotular y lacrar el material obtenido. También puede sugerirse la realización de extendidos sobre porta objetos de vidrio.

2.3.10 Manchas de semen.

El elemento de importancia es el espermatozoide y su observación en forma completa es prueba irrefutable de la presencia de esperma. Dicha célula es muy lábil, siendo habitual que la cabeza se separe de la cola, imposibilitando el diagnóstico. Es menester secar las prendas, ya que la humedad afecta los espermatozoides. En caso de obtener hisopados deben colocarse en tubos de ensayo ó cónicos con tapa a rosca (limpios, secos y estériles).

Realizar extendidos sobre porta objetos de vidrio, dejar secar y luego envolverlos con papel, separando uno de otro y rotular para su posterior identificación, cumplimentando en todos los casos las garantías de ley.

2.4 Recolección de muestras para análisis en química ambiental.

A continuación se describen los procedimientos que deben seguirse para la correcta toma de muestras de tipo ambiental (aguas, barros, sedimentos y efluentes industriales) donde se excluyen las muestras de tipo aire dado la complejidad de las mismas en cuanto a equipamiento, instrumental y variedad de posibilidades.

2.4.1 Muestreo, preservación y almacenamiento de muestras de agua.

El correcto resultado de una determinación no depende tan sólo del análisis propiamente dicho. Esto se logra asegurándose una buena recolección de la muestra y una eficaz preservación hasta el momento de su análisis. Ciertos parámetros conviene determinarlos in

situ, por ejemplo: temperatura, gases disueltos, pH, cloro residual, turbidez y color. Es muy importante que la muestra obtenida sea representativa del curso de agua a analizar.

En todos los casos, aunque los frascos estén perfectamente limpios, deben ser enjuagados con la muestra 3 ó 4 veces.

Es de suma importancia que al entregar una muestra al laboratorio, el frasco esté bien rotulado, consignando en él la fecha y hora del muestreo, la localización y el nombre del operador. Es conveniente que la solicitud de análisis llegue al laboratorio acompañada de una planilla donde se encuentren los datos obtenidos en campo.

2.4.2 Toma de muestras de aguas para examen bacteriológico.

Una muestra mal extraída llevará a conclusiones erróneas en lo referente a la calidad del agua que pretende representar.

Para el caso de muestras de agua obtenidas de grifo, debe elegirse aquel que esté comunicado directamente a la cañería de distribución, es decir, que el ramal en que se encuentre el grifo no debe estar conectado con tanques domiciliarios, filtros, ablandadores ú otros artefactos similares.

Los procedimientos que se realizan en la rutina de la toma de muestra de agua comprenden:

- Limpiar la boca del grifo.
- Abrir el grifo totalmente y dejar fluir el agua durante 5 minutos.
- Cerrar el grifo.
- Esterilizar el grifo calentando la boca del mismo durante 2 minutos con llama de una lámpara de alcohol ó con un hisopo de algodón embebido en alcohol.
- Abrir nuevamente el grifo y dejar fluir el agua durante 10 minutos.
- Destapar cuidadosamente el frasco evitando todo contacto de los dedos con la boca del mismo y con la tapa.
- Llenar el frasco, colocar la tapa inmediatamente.
- Rotular y remitir refrigerado a 4ºC, de inmediato al Laboratorio.

Para el caso de un grifo situado en la cañería de un pozo semisurgente, se debe abrir el grifo y dejar fluir el agua durante 30 minutos (si se trata de un pozo de uso continuo) o durante 5 horas (si se trata de un pozo que se utiliza poco ó si está fuera de servicio). A continuación proceder según la técnica detallada anteriormente.

2.4.3 Toma de muestras de aguas para examen físico-químico.

En este caso se debe tomar en cantidad suficiente (generalmente 1 litro) de muestra y envasarla en un recipiente limpio Los recipientes no deben necesariamente estar esterilizados. Rotular y remitir al laboratorio.

2.4.4 Toma de Muestra de barros ó sedimentos.

En todos los casos deben tomarse los mismos en frascos de boca ancha, debidamente identificados con rótulos a tal fin. Remitir al Laboratorio sin preservante de ningún tipo. La cantidad a recoger será de unos 300 grs. Tomar la muestra con espátulas ó dispositivo ad-hoc.

2.4.5 Toma de muestra de efluentes industriales.

Debe tomarse la muestra a la salida del establecimiento en cantidad acorde a los parámetros a medir y utilizar los envases según indicación del perito. Enjuagar varias veces el recipiente con el líquido del efluente. Remitir la muestra al Laboratorio rotulada.

Bibliografía.

La evidencia Medico-legal en delitos contra las personas y muertes violentas. Ferrari L. A. en Laguens R. M. Editorial S.C.J.B.A, 2000.

Instructivo para tomas de muestra para análisis toxicológicos clínicos. López, C. M. Red REDARTOX, Argentina, 2001.

Laboratory Guidelines for toxicological analysis. de Zeeuw R. A. et al. Bull. The Int. Assoc. For. Toxicologists, 31 (4) 23-26, 2001.

Postmortem production of Ethanol and factors that influence interpretation. A critical review. O'Neal, C; Poklis, A. The Am. Journal For. Med and Pathol., 17 (1) 8-20, 1996

Pelos y uñas como herrarmientas en el estudio de drogas de uso indebido. Ferrari, L.A; Arado M.G. Actas de las 1^{ras} Jornadas Toxicológicas del Interior. Ed. por el Colegio Bioquímico de Córdoba., p.35-39, 2000.

Pre-analytical aspects in postmortem toxicology: Skoop, G. Forensic Sci. Int. 142, 75-100, 2004

Stability of drugs postmortem: a review. Drummer O. H. Proceedings 35th TIAFT meetings. University of Padova, 13-18, 1997.

Clarke's analysis of drugs and poisons. Widdop, Moffat, Osselton Eds. Vol I. Pharmaceutical press, 2004.

Analysis of postmortem bone/bone marrow specimens for drugs of importance in forensic toxicology. McGrath K & Jenkins, A. Justice & Health p.362, 2004

Guía de toma de muestra, conservación, transporte y análisis toxicológico. Resol. 650/02 del Ministerio de Salud de la Nación, 2002

Capítulo 3
Toxicología Analítica.

Autores:
Dra. Leda Giannuzzi.
Profesora Adjunta de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la UNLP.
Bioq. Angeles de Cristófano.
Profesional del Laboratorio de Control Antidoping dependiente de Lotería de la Provincia de Buenos Aires.
Bioq. Cristian Oliver.
Perito de la Sección de Toxicología del Laboratorio Químico Pericial de la Dirección General de Policía Científica de la Policía de la Provincia de Buenos Aires.
Docente de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la UNLP.

3. Introducción.

En el contexto de las Ciencias Forenses la Toxicología Analítica se halla directamente involucrada en diversos aspectos de la toxicología experimental y aplicada.

En el presente manual se describirán las técnicas usadas en la determinación de tóxicos gaseosos y volátiles (monóxido de carbono, ácido cianhídrico y cianuros, alcoholes, etc.) y tóxicos orgánicos no volátiles (drogas, tanto prescriptas como ilegales, pesticidas, toxinas, etc) y metales. Los últimos capítulos están dedicados a la Química Legal (explosivos, semen, sangre, tinta). Esta clasificación se relaciona estrechamente con los métodos para separar los agentes tóxicos de la matriz en la que se encuentran. El agente de interés puede existir en una solución simple o puede estar unido a proteínas u otros constituyentes celulares. El objetivo es separar el agente tóxico en cantidad y pureza suficientes para permitir su caracterización y cuantificación. A su vez el compuesto madre no siempre está presente en cantidades importantes como para ser separado y los metabolitos conocidos pueden proveer indirectamente la información de la sustancia madre. Sólo recientemente han surgido métodos disponibles que permiten la medida directa de algunos analitos sin la separación previa de su matriz.

El procedimiento analítico toxicológico incluye usualmente dos pasos. El primero consiste en realizar un análisis preliminar que permite identificar las muestras negativas, que no contienen el analito o alguno de sus metabolitos de las drogas u otros tóxicos que pudieran estar presentes en la muestra (pruebas de screening o tamizado). El segundo paso involucra la confirmación de la identidad de las sustancias presentes en las muestras positivas.

Las pruebas de screening proveen sólo resultados preliminares y tienen poder de decisión. Indican claramente la ausencia de una droga, es decir, no informan falsos negativos. Sin embargo, un resultado positivo debe ser confirmado por otro método específico. Siempre debe realizarse al mismo tiempo que se analiza la muestra un control positivo y uno negativo. Un control negativo (blanco) ayuda a asegurar que falsos positivos (por ejemplo contaminación con reactivos o material de vidrio con el analito en cuestión o la presencia de componentes de la muestra) no sea obtenido. Igualmente, la inclusión de un falso positivo sirve para asegurar que los reactivos han sido preparados en forma correcta y han mantenido su estabilidad. Un resultado sospechoso falso positivo debe ser repetido usando material de vidrio correctamente lavado y enjuagado finalmente con agua bidestilada. En toda circunstancia los ensayos de comprobación deben realizarse sobre una nueva alícuota de la muestra, lo cual implica que en el momento de decidir que ensayos van a realizarse debe considerarse reservar un volumen adecuado para confirmar el resultado.

El material de vidrio debe estar escrupulosamente lavado a efectos de evitar contaminaciones inesperadas. Así, el material de vidrio debe ser tratado por inmersión en solución sulfocrómica (ácido sulfúrico concentrado densidad 1,83 conteniendo 100 g/litro de dicromato de potasio (ácido/dicromato, ácido crómico) uno o dos días y luego sometido a un profundo enjuague. Los ensayos de tamizado o preliminares emplean generalmente técnicas inmunoquímicas debido a la rapidez y su aplicación a un amplio rango de analitos.

El segundo paso anteriormente descrito se refiere a la confirmación que permite asegurar la exactitud y fiabilidad del resultado. Este paso se realiza mediante técnicas basadas en principios físico-químicos diferentes de las usadas para la identificación y deben involucrar técnicas estructurales (espectrometría de masa, infrarrojo, NMR) y al menos tan sensibles como las de screening. Así, la cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta presión (HPLC) son las que generalmente se emplean en este paso. Se recomienda el uso de la espectrometría de masas (MS) acoplada bien a la cromatografía de gases (GC/MS) o a la cromatografía líquida (HPLC/MS) para aumentar la sensibilidad y especificidad del análisis.

La cuantificación emplea métodos específicos y sustancias de referencia certificadas así como estándares internos. Estos últimos son sustancias que deben poseer característica física y química similar posible al analito. Por este motivo, en los análisis por GC/MS son ideales las sustancias deuteradas de los analitos en estudio como estándares internos. Estos compuestos se deben añadir al principio del procesado de la muestra y siempre antes de someterla a una extracción con el objeto de evaluar la recuperación del método. Los marcadores que se añaden después de la extracción se conocen como patrones externos.

La elección de un método analítico se realiza en función del menor número de errores aleatorios o sistemáticos que pueda generar y debe ser vigilado por el programa de Garantía de Calidad. Previamente debe realizarse una revisión bibliográfica y se deben considerar los instrumentos disponibles y la duración de los análisis. Posteriormente hay que comprobar parámetros tales como:

- **Linealidad:**consiste en verificar que, en el patrón de calibración utilizado, la relación entre la respuesta, definida por el área o altura de los picos cromatográficos y la concentración, es lineal en el intervalo de concentraciones presentes en las muestras analizadas.

- **Sensibilidad**: un método es sensible cuando cambios pequeños de concentraciones originan cambios significativos en la respuesta analítica. El límite de detección se define como la señal más baja del analito, expresada en concentración, que se puede diferenciar de un blanco analizado en las mismas condiciones. El límite de cuantificación es la concentración más baja que se puede determinar con seguridad y precisión aceptables y debe ser, al menos, dos veces el valor del límite de detección.

- **Recuperación**: Se determina en una muestra a la que se le agrega patrones de concentración conocida del analito en cuestión y procesada con igual método analítico que el empleado en las muestras de concentración desconocida. Esta concentración obtenida se la relaciona con la obtenida a partir de un patrón puro que no ha sido sometido a ningún tratamiento.

- **Precisión:**es una medida del error variable y se define como la concordancia entre medidas repetidas de la misma muestra. Existen dos tipos: intraensayo e interensayo, también conocida como reproducibilidad.

- **Seguridad o exactitud**: es la medida del error sistemático y se define como la concordancia entre el valor medio medido y el valor de referencia aceptado.

Siempre que no se utilice un método oficial de análisis, como los de la AOAC (Analitical Official Analysis Chemical), es conveniente validar el método usado. La validación es un proceso por el cual se evalúan las características de un método y se comprueba que las mismas cumplen una serie de requisitos preestablecidos. Es una parte muy importante del programa de garantía de calidad y permite asegurar que los resultados analíticos tienen la exactitud adecuada para su aplicación.

En toxicología analítica se utilizan con frecuencia el sistema de unidades internacionales (SI) de masas en los cuales deben ser informados los resultados de los análisis cuantitativos. El fentogramo (fg) = 10^{-15}g, picogramo (pg) = 10^{-12}g, nanogramo (ng) = 10^{-9}, microgramo (μg) = 10^{-6}g, miligramo (mg) = 10^{-3}g, gramo (g) y kilogramo (Kg)=10^{3}g son las unidades de masas utilizadas; siendo el litro (L) la unidad de volumen. Otras unidades de concentración empleadas son: mg %, mg/dL, μg/ml, y ppm (partes por millón). Resulta útil recordar que 1mg/L = 1ppm = 1 μg/ml = 0.1 mg% = 0.1mg/dl.

Los avances en la instrumentación analítica permiten aumentar la sensibilidad en las determinaciones de las sustancias que se desean investigar, lográndose cuantificar cantidades del orden de los fentogramos. Si bien ello es altamente deseable para el analista toxicológico, pueden presentarse en algunos casos el riesgo de informar resultados falsos positivos especialmente en los análisis de drogas de abuso. Debido a ello, deben establecer valores de corte o cut-off, también llamados umbrales positivos.

Estos valores de corte son las concentraciones de los analitos por encima de las cuales se considera como seguro un resultado positivo. Estos valores tendrían que estar consensuados entre todos los laboratorios y deberían ser diferentes según se aplicaran en toxicología clínica, forense, laboral, ambiental, etc.

3.1 Garantía de calidad.

Un laboratorio toxicológico proporciona resultados epidemiológicos, de diagnóstico, terapéuticos, etc., en el ámbito clínico, laboral, legal, deportivo, etc., donde los posibles errores analíticos pueden influir enormemente en la libertad y derechos civiles del individuo y en la salud. Por ello, las mediciones analíticas deben realizarse de forma tal que satisfagan un requerimiento acordado como ser un sistema de calidad que produzca resultados de alta calidad. También es necesario contar con un control de calidad que diseñe las actividades para proporcionar dichos resultados y por último una garantía de calidad que asegure que las actuaciones del control de calidad se ejecuten correctamente.

La garantía de calidad ha sido definida como "el conjunto de acciones realizadas para asegurar la fiabilidad de los resultados", e incluye todos los procedimientos cognoscitivos y mecánicos, diseñados para minimizar o identificar todas las fuentes de variaciones pre-

analíticas, analíticas y post-analíticas, que puedan influir en la obtención de resultados de gran calidad analítica.

Basándose en la definición anterior, un laboratorio analítico debería realizar su propia garantía de calidad en tres niveles diferentes, que abarcaran todos los aspectos de sus actividades, incluyendo las funciones administrativas y que serian los siguientes:

- Logístico-estructural: que incluye el espacio del laboratorio, reactivos, equipos, instrumentación, personal y los procedimientos de cadena de custodia
- Analítico-interpretativo: que incluye muestreo (recolección, selección y almacenamiento), preparación de la muestra, disponibilidad de materiales de referencia, selección del método analítico, revisión de los resultados por personal especializado y formatos del informe.

El Control de Calidad provee un medio para detectar errores inaceptables en el caso que surjan evitando la entrega de resultados inexactos. Además genera información que puede ser usada para recuperar o rastrear datos. En el caso que surjan errores, ofrece un medio para identificar la causa y la manera de tomas medidas para solucionarlos. El control de calidad incluye controles de calidad internos y la participación en controles de calidad externos para comprobar la efectividad de la garantía de calidad.

El control de calidad interno en laboratorios analíticos es la verificación final de la correcta ejecución de todos los procedimientos (incluyendo la calibración) que están descriptos en el protocolo analítico y de todas las medidas a tomar para asegurar las buenas prácticas de laboratorio. Se lleva a cabo incluyendo materiales de referencia especiales, llamados “materiales de control” en la secuencia analítica. Los materiales de control deben ser en lo posible representativos de los materiales que se están ensayando en lo respecta en la composición de la matriz, el estado físico de preparación y del intervalo de concentración del analito. Tanto los materiales de control como aquellos usados para las calibraciones deberán ser trazables a materiales de referencia certificados o por lo menos a un método de referencia reconocido.

La importancia y trascendencia de los análisis toxicológicos ha motivado que algunos organismos internacionales establezcan normativas para garantizar la calidad y fiabilidad de los resultados. Entre ellos se encuentran el National Institute of Drugs of Abuse (NIDA, 1988), la Society of Forensic Toxicologists y la American Academy of Forensic Sciences (SOFT/AAFS, 1997), la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1993), la International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT, 1994) y la Society of Hair Testing (SHT, 1997).

Las instalaciones del laboratorio deben ser tales que permitan la producción de datos analíticos de alta calidad y han de estar dirigido por una persona adecuadamente calificada, que organice la parte científica y al mismo tiempo sea capaz de aplicar técnicas de administración de personal y, finalmente, el equipo técnico integrante debe poseer adecuada educación profesional y entrenamiento y entender la importancia del programa de calidad y el papel que cada empleado desempeñe en él.

La adecuada elección, recolección y envío de las muestras resultan ser muy importantes en los análisis toxicológicos, ya que la calidad de un resultado nunca puede ser mejor que la de la muestra. Deben proporcionarse instrucciones detalladas a todas las agencias y entidades que trabajen con el laboratorio, que deben incluir el tipo y la cantidad mínima de muestra requerida, el tipo y cantidad de conservante que se debe añadir, instrucciones para el adecuado etiquetado de los contenedores, así como las condiciones para el empaquetado y transporte. Debe existir una cadena de custodia, reflejada en una documentación que debe acompañar a las muestras desde el lugar de recogida hasta el laboratorio junto con la petición del análisis.

La cadena de custodia debe empezar en el momento de la toma de muestra, debiendo quedar recogido en la documentación cualquier manipulación o transporte desde un individuo o lugar a otro, al tiempo que se debe intentar minimizar en lo posible el número de personas que manipulen la muestra.

El procedimiento analítico incluye, usualmente, dos pasos: un análisis preliminar que permita identificar las muestras negativas, que no contienen ninguna sustancia o metabolito, o detectar las drogas u otros tóxicos que pudieran estar presentes en la muestra; el segundo paso sería la confirmación de la identidad de las sustancias presentes en las muestras positivas.

Actualmente existen programas de control de calidad externo abiertos bien establecidos para el análisis de orina en USA por el American College of Patologists, la Association of Clinical Chemists, la American Academy of Forensic Sciences y la Californian Association of Toxicologists y en países europeos como Holanda, por el Kwaliteitsbewaking Klinishe Geneesmiddelanalyse en Toxicologie, España por el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM), en Italia por el Centre of Behavioural and Forensic Toxicology (CBFT), etc.

Antes de emitir el informe, todos los datos analíticos deben ser revisados por una persona con capacidad científica y con experiencia en los métodos analíticos empleados. La revisión debe incluir, al menos, documentación sobre la cadena de custodia, validez de los datos analíticos cualitativos y cuantitativos (cromatogramas de la muestra, de patrones y de un blanco)

y datos del control de calidad. Por último se emitirá un informe escrito que presente los resultados del análisis y toda la información relevante de forma clara, exacta y sin ambigüedades (International Standards Organization, 1982).

Además es necesario disponer de un archivo de registros, que documente las actividades y operaciones llevadas a cabo y que incluya una copia del informe, datos de la cadena de custodia, hojas de trabajo, datos de laboratorio y registros de los análisis de garantía de calidad y de los controles de calidad. Todo esto debe ser lo más claro posible de manera que nos permita seguir todos los pasos del análisis y sacar conclusiones en caso de desviaciones. Se deben guardar durante un tiempo, que depende de las normativas gubernamentales, pero que, en general, es como mínimo de cinco años y tienen, por tanto, un valor potencial a largo plazo, sobre todo en los análisis toxicológicos que puedan estar envueltos en litigios, especialmente cuando los juicios se celebran años después de haber emitido el informe.

Los programas de control de calidad externo pueden tener dos objetivos diferentes

- Educacional: cuando se pretende mejorar los resultados de los laboratorios participantes, tener un sistema para comprobar la fiabilidad de los datos analíticos, tener un empuje para solucionar los pequeños fallos detectados y para poseer un sistema de intercambio de información científica y técnica.

- Acreditación: cuando se pretende poseer una base racional para la selección o licencia de un laboratorio para una tarea determinada o, del mismo modo, para descalificarlo para esta tarea si los resultados están por debajo de un cierto nivel.

- Uno de los motivos de la gran disparidad en los resultados de los controles de calidad interlaboratorio es la gran variedad de métodos analíticos empleados, ya que, prácticamente, cada laboratorio emplea el suyo propio, que es diferente de los demás.

Los laboratorios que realicen análisis toxicológicos deberían estar acreditados, como ya se exige a los centros de control antidoping o a los que hacen análisis de drogas en el ambiente laboral en algunos países. Esta acreditación permitiría la autoregulación para asegurar la fiabilidad de nuestros resultados, reduciría el potencial para trabajos incompletos o imperfectos y ayudaría a establecer argumentos razonables cuando nuestro trabajo pudiera ser juzgado.

3.2 Analítica de los Tóxicos Gaseosos y Volátiles.

La determinación de tóxicos volátiles y gaseosos presentan ciertas similitudes en los métodos de detección y por ello, se analiza la analítica de los mismos en forma conjunta. El aislamiento de tóxicos volátiles del material que lo contienen se realiza a través de la destilación en sus diversas variantes, los cuales se desarrollarán a continuación. Posteriormente al aislamiento, se realiza la cuantificación de las sustancias en estudio mediante el empleo de diversas metodologías como cromatografía gaseosa (CG), cromatografla gaseosa de alta resolución (HRCG) con empleo de columnas capilares, métodos enzimáticos, métodos acoplados, etc.

3.2.1 Destilación.

A través de la destilación simple y fraccionada pueden separarse sustancias volátiles de mezclas homogéneas. Pueden separarse sustancias solubles en el medio en que se encuentran, generalmente acuoso (tejido, orina, sangre, etc.). La destilación simple presenta aplicación limitada debido a que los puntos de ebullición de las sustancias a separar deben diferir al menos como 30°C y por otra parte, se requiere una cantidad de muestra considerable. En cambio, a través de la destilación fraccionada pueden separarse sustancias cuyos puntos de ebullición se encuentren más cercanos.

En Toxicología una técnica muy apropiada es la destilación con arrastre por vapor dado que proporciona varias ventajas con respecto a las anteriores. Es de suma importancia en el caso en que sea necesario separar una pequeña porción de un compuesto débilmente volátil de un material no volátil. Como técnica, puede ser directa o indirecta. En el caso de la destilación con arrastre por vapor directa, el vapor de agua se genera en el mismo recipiente que contiene la muestra, mientras que en la indirecta el vapor se genera en un recipiente y se hace burbujear en otro que contiene la muestra con el material biológico (por ejemplo, vísceras). Se recomienda el empleo de la destilación indirecta en el caso en que puedan registrarse proyecciones o carbonización de la muestra.

- **Fundamento de la destilación con arrastre por vapor.**

Si dos sustancias (un compuesto de escasa volatilidad y agua del material biológico) son insolubles, las presiones parciales de ambas sustancias se suman para dar una presión de vapor total. Cuando la suma de estas presiones es iguala a la presión atmosférica ambas

destilarán juntos. Así, la mezcla destilará por debajo del punto de ebullición de cada una de las sustancias presentes. Este hecho hace posible la separación de sustancias con alto punto de ebullición a bajas temperaturas, resultando muy adecuada su aplicación a sustancias que se descomponen. La recolección del destilado puede realizarse a través de una fracción única o varias de menor volumen. En esta última modalidad, las primeras fracciones tendrán una alta concentración de los tóxicos más volátiles y las posteriores estarán más enriquecidas en los menos volátiles.

Estos conceptos se aplican a menudo en toxicología al separar compuestos volátiles ácidos y básicos. Al respecto, se realizan dos destilaciones: una en medio ácido en la que se recogen los tóxicos volátiles ácidos y neutros y otra en medio alcalino en la que se separan los tóxicos volátiles alcalinos.

- **Destilación en medio ácido.**

A partir de alrededor de 100 gr de material (almacenado a bajas temperaturas para evitar pérdidas por volatilización) se procede a la maceración con igual cantidad de agua destilada a fin de obtener una papilla fluida. Se incorpora la misma a un balón de destilación, se acidífica con ácido tartárico al 10% y se adiciona gotas de silicona como antiespumante. El balón se coloca en un manto calefactor o en un baño de agua, conectándose al refrigerante por un lado y al generador de vapor por otro (en el caso de una destilación indirecta). Se coloca un pequeño volumen de agua en el tubo colector el que puede refrigerarse exteriormente con hielo efectuándose la destilación hasta recoger un volumen de destilado similar al de la muestra original.ediante la acidez tartárica se logra un pH adecuado y se evitan alteraciones eventuales de ciertos complejos; en algunos casos (fenoles), aconsejándose el tratamiento con solución de ácido sulfúrico 20%. El aspecto del destilado es generalmente límpido salvo en el caso de vísceras o del material biológico por destilación de ácidos grasos de bajo peso molecular o por solventes no miscibles con agua. Los compuestos orgánicos de carácter ácido o neutro y de bajo peso molecular (alcoholes, cetonas, aldehídos, ácidos, fenoles, hidrocarburos alifáticos, aromáticos y halogenados) pueden ser aislados por destilación en medio ácido.

- **Destilación en medio alcalino.**

La solución remanente de la destilación en medio ácido se deja enfriar, se trata con solución de NaOH 10% hasta pH 10 o bien con un exceso de OMg. Es aconsejable el agregado de un antiespumante también en esta destilación. Dado que el tratamiento con NaOH puede dar lugar a descomposiciones se prefiere el agregado de OMg, aunque con este agente no se

obtiene una destilación completa. El destilado se recoge en ClH 2N, lo que permite fijar las bases volátiles. Es importante controlar el pH del destilado ya que puede requerir un agregado posterior de HCl. Se continúa hasta la obtención de 80 a 100 ml. Dicho destilado, además de contener las bases volátiles salificadas, presenta cierta proporción de NH_4Cl y un exceso de ácido fijador. Los compuestos de carácter básico como aminas, iminas, alifáticas y/o aromáticas) son retenidas por transformación en las sales correspondientes.

3.2.3 Microdifusión.

La microdifusión es un procedimiento muy útil para aislar e identificar tóxicos volátiles, pudiendo aplicarse a muestras de sangre, orina y saliva. El fundamento de esta técnica es el siguiente: si una solución de una sustancia volátil y un solvente puro se mantienen en compartimentos separados pero en contacto con la misma atmósfera, el soluto volátil tenderá a particionarse en el solvente puro. De esta manera, se logra la difusión del soluto volátil desde la solución inicial al solvente hasta que se llegue a un equilibrio. Si se dispone de una sustancia que convierta el soluto volátil en no volátil, la difusión ocurre hasta que la presión de vapor en la atmósfera disminuya hasta casi cero. La microdifusión se realiza en cámaras de Conway (**Fig. 3.1**) que poseen dos compartimentos: externo (muestra y agente liberador) e interno (agente atrapante). En cada caso, se produce la captación y/o reacción del tóxico volátil produciéndose la remoción completa del primer compuesto al cabo de un tiempo y temperatura previamente determinados.

En este sistema es necesario examinar una serie de equilibrios que determinan las condiciones en las que finalmente ocurrirá la separación del analito desde la muestra.

Fig. 3.1 Cámara de Conway

En el compartimento externo se debe tener en cuenta por un lado los equilibrios en fase líquida de disociación, adsorción o formación de complejos del analito (A_{ext}) con los restantes elementos de la matriz que constituye la muestra. Así por ejemplo, en la microdifusión del monóxido de carbono (CO) desde sangre es necesario considerar la formación del complejo con el grupo hemo de la hemoglobina y en la separación del ácido cianhídrico (HCN) desde cualquier matriz líquida es necesario considerar su constante de disociación ácida. En ambos casos (carboxihemoglobina y cianuro) se encuentra presente una forma no volátil del analito $(A_{ext})^*$.

En la volatilización del analito (A_{vol}) desde el compartimento externo y su posterior disolución en el compartimento interno también se involucran las respectivas constantes de equilibrio. Finalmente, el analito en el compartimento interno (A_{int}), por acción del agente atrapante, puede mantener un equilibrio con una forma no volátil del mismo.

Finalmente, puede formarse un complejo o un producto de oxidación el cual se denomina $(A_{int})^*$. El proceso en su conjunto, entonces, estará establecido por las condiciones en que se realiza y en qué medida estas modifican cada una de las constantes de equilibrio involucradas.

$$\mathbf{A(ext)^* \xleftrightarrow{k1} A(ext) \xleftrightarrow{K2} A(vol) \xleftrightarrow{K3} A(int) \xleftrightarrow{K4} A(int)^*}$$

El diseño de cada experiencia de microdifusión deberá considerar las constantes de equilibrio que incidirán en un procedimiento para la separación cuantitativa del analito en cuestión y necesariamente los resultados se refieren a una curva de calibración construida con patrones de concentración conocida.

3.2.4 Cromatografía gaseosa (CG).

Los métodos de cromatografía gaseosa son los de mayor aceptación en la actualidad. La cromatografía gaseosa es un método de gran valor para la cuantificación de los tóxicos gaseosos y volátiles dado que presenta rapidez, especificidad y gran sensibilidad. En Inglaterra, se utiliza como el método oficial para la determinación de la alcoholemia (tenor de alcohol en sangre) especialmente en aquellos sujetos en los cuales la prueba con un analizador de aire

espirado se traduce en la sospecha que se encontraban bajo la influencia del alcohol. Para tóxicos gaseosos, el método de elección es la cromatografía de head-space. En esta se permite el equilibro de la fase líquida de la muestra con su fase vapor, dentro de un frasco de tapón perforable de donde se extrae una alícuota del vapor para analizarla en el cromatógrafo.

La cromatografía de gases (GC) permite la separación e identificación de compuestos volátiles en mezclas complejas. Esquemáticamente el proceso que tiene lugar en un cromatógrafo de gases es el siguiente: la muestra líquida se vaporiza en un inyector que está a temperatura elevada, donde una corriente de gas portador inerte y de alta pureza lo arrastra a lo largo de la columna. Allí tiene lugar el proceso de separación bajo condiciones controladas de temperatura; posteriormente el efluente de la columna pasa a un detector termostatizado, cuya señal se recoge en función del tiempo en una carta o cromatograma.

La separación por GC de los distintos compuestos presentes en una muestra depende de la diferencia en sus coeficientes de distribución entre la fase móvil y la estacionaria a una temperatura determinada, conociéndose perfectamente las condiciones para esta separación.

Las fases estacionarias empleadas más frecuentemente, debido a su universalidad, son las de silicona, como metilsilicona o 2-5% fenilmetilsilicona. Algunas fases estacionarias moderadamente polares, como 14% cianopropil metilsilicona, también han sido propuestas

En cuanto al tipo y dimensiones de la columna, las primeras columnas eran empaquetadas, de vidrio o metálicas, de 2-6 mm de diámetro interno, donde la fase estacionaria estaba adsorbida sobre un material inerte. Pero la aparición, en los años setenta, de las columnas capilares las desplazó completamente, debido a su mejor eficacia separativa, ruido de fondo más bajo así como su mayor inercia y sensibilidad.

Actualmente las columnas que se emplean son de sílice fundida, con una longitud de 12-30 metros, un diámetro interno que oscila entre 0,2 y 0,25 mm, en la que la fase estacionaria se encuentra ligada químicamente a sus paredes con un grosor de película entre 0,25 y 0,33 mm. El gas portador empleado suele ser He, cuyo flujo en los instrumentos modernos se mantiene constante aunque se produzca un aumento de las temperaturas.

Para mejorar la separación el calentamiento del horno se realiza de forma programada, pudiendo consistir en una única rampa de temperatura, que empieza a 40-100 ºC hasta 280-310 ºC a una velocidad de 5-30 ºC/min, otros proponen dos rampas, una primera rápida a 20-40 ºC/min. seguida de otra más lenta a 10 ºC/min. Incluso algún autor llega a proponer un programa de temperaturas con cuatro rampas.

Existe una gran variedad de detectores aplicables en GC, como el de conductividad térmica (TCD), de ionización de llama (FID), de nitrógeno-fósforo (NPD), de captura de electrones (ECD), de fotoionización (PID), fotométrico de llama (FPD) o de conductividad electrolítica. De todos ellos, tres son los que encuentran una mayor aplicación en el análisis toxicológico. Así, al principio la identificación se realizaba con detectores no selectivos como los FID, que responden a prácticamente todo tipo de compuestos. Posteriormente, la introducción de detectores más selectivos como el NPD supuso una considerable evolución; este detector es específico y considerablemente más sensible para los compuestos que contienen átomos de N o P en su molécula, siendo particularmente útil para el análisis de drogas de abuso y medicamentos, ya que la mayoría de ellos poseen átomos de N, así como en el análisis de plaguicidas que contengan átomos de N y/o P. Otro de los detectores selectivos que se emplean actualmente es el ECD, que posee gran sensibilidad para los compuestos electronegativos con átomos de halógenos o grupos nitro o carboxilo en su molécula.

Los compuestos presentes en la muestra se identifican por sus tiempos de retención, que es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que cada compuesto presente en la misma llega al detector. En la práctica se usa más el tiempo de retención relativo. Estos parámetros son una propiedad característica de cada compuesto en unas condiciones cromatográficas específicas, pero no son un sistema satisfactorio de identificación, ya que las condiciones operativas no se pueden reproducir fiablemente de un laboratorio a otro, no permitiendo la estandarización, que, por otra parte, se puede conseguir mediante otros parámetros, como son los índices de Kovats. Más recientemente se han desarrollado algoritmos y otros métodos de búsqueda para automatizar el barrido. El área del pico es proporcional a la cantidad del compuesto. Consecuentemente, la GC nos proporciona información de la identidad y cantidad de los compuestos analizados.

Los problemas con esta técnica se presentan cuando se trata de analizar compuestos de elevado peso molecular, termolábiles o polares. Desafortunadamente muchos tóxicos poseen grupos funcionales polares. Además durante los procesos metabólicos de biotransformación se introducen grupos polares en las moléculas para disminuir el carácter lipofílico y favorecer la excreción en la orina. Los métodos convencionales de GC no permiten el análisis de estas sustancias polares, por lo que la modificación de la molécula, mediante una derivatización adecuada, es un prerrequisito imprescindible.

Otra gran limitación de la CG es que la información que proporciona no es definitiva, se basa sólo en el tiempo de retención y puede ocurrir que haya sustancias que eluyan juntas o

muy próximas, por lo que se requiere un método de confirmación, como el que nos proporciona la espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (MS) se acopló a los métodos cromatográficos, lo que revolucionó el análisis de mezclas de compuestos orgánicos debido a su sensibilidad y especificidad. Detectores selectivos de masas llevó que la cromatografía de gases acoplada a la MS (CG/MS) se convirtiese en la técnica instrumental más adecuada para la identificación y cuantificación de moléculas orgánicas

Aunque existen otros, los dos métodos de ionización más usados en la actualidad son el impacto electrónico (*EI*) y la ionización química (CI). El *EI* es un proceso físico donde se transfiere energía mediante la colisión de electrones con las moléculas de la muestra, lo que origina su fragmentación en iones. El espectro de impacto electrónico resultante es altamente reproducible y característico de la molécula en estudio. La *CI*, en cambio, es un fenómeno químico, donde la muestra se mezcla con un exceso de gas ionizante, como metano, isobutano amoniaco, etc. originándose nuevos iones con una unidad de masa mayor que el peso molecular. En esta ionización se originan muy pocos iones de fragmentación, y el M+1 producido es el mas intenso de todo el espectro.

En cuanto a la detección, los espectrómetros de masas actuales pueden operar en dos modos diferentes, el de registro total o *full scan* y el de iones seleccionados *selected ion monitoring* (SIM). En la modalidad de registro total, el espectrómetro barre todos los iones presentes dentro de un rango de valores masa/carga, que normalmente oscila entre 40 y 650. El espectro de masas o patrón de fragmentación obtenido proporciona una información estructural muy útil. Esta modalidad de registro total también se puede aplicar al análisis cuantitativo, no obstante, para este propósito es preferible el SIM, sobre todo cuando las concentraciones son muy bajas.

En la modalidad SIM, el instrumento se prepara para detectar únicamente uno (*single ion monitoring*) o varios (*multiple ion monitoring*) iones de abundancia relativamente grande, o de relación masa/carga significativa, en el espectro de masas del compuesto de interés, resultando un cromatograma que responde sólo a compuestos en cuya fragmentación estén presentes los iones seleccionados.

La elección del modo de ionización y de detección dependerá de los requerimientos del análisis, ya que como hemos visto anteriormente cada uno proporciona una información diferente. La modalidad SIM es sólo posible cuando se conocen el espectro de masas y el

tiempo de retención de los analitos y es la de elección para el análisis cuantitativo, debido a su mayor sensibilidad sobre el *full scan*, tiempos de barridos más cortos y mejor resolución en la sobreposición de picos. Por otro lado, la ionización mediante EI usando la modalidad de *full scan* es, obviamente, la que tiene mayor aplicabilidad en el campo toxicológico, ya que el espectro de *EI* que se obtiene, en estas condiciones, es como una huella dactilar, que contiene suficiente información para caracterizar la molécula, permitiendo confirmar su identidad, o, en el caso que ésta se desconozca, buscarla en las librerías de espectros de referencia que estén disponibles.

Los detectores de masas de doble cuadrupolo (MS-MS) o incluso de triple (MS-MS-MS) se caracterizan por su gran sensibilidad, del orden de los fentogramos, y selectividad, ya que en esta modalidad se selecciona un ion del espectro de masas original, el cual es sometido a una nueva fragmentación en el otro cuadrupolo. Para confirmar la presencia de un compuesto han de coincidir los dos patrones de fragmentación.

Al igual que en GC, no todos los compuestos orgánicos se pueden analizar por esta técnica, debido a su termolabilidad, polaridad o falta de volatilidad. Aunque en muchos de ellos se puede aplicar otra técnica como HPLC o HPLC-MS, en algunos casos el problema se solventa con una derivatización previa al análisis por GC-MS.

La formación de derivados, previa a la inyección de la muestra empezó a utilizarse en 1953, casi al mismo tiempo que la GC. Tienen como objetivo modificar la estructura de la molécula del analito, y son un prerrequisito antes del análisis por GC y GC/MS de compuestos no volátiles, termolábiles y polares. La disminución de la polaridad también mejora las propiedades cromatográficas de los compuestos, minimizando la adsorción en la columna y proporcionando, consecuentemente picos con mejor resolución. La derivatización cambia el tiempo de retención y el patrón de fragmentación del espectro de masas, al mismo tiempo que proporciona más información estructural, sobre todo en moléculas con espectros de masas muy pobres, como anfetamina, MDMA, etc. Normalmente se obtienen espectros de masas con iones de relación masa/carga mas alta y mayor abundancia, evitándose las interferencias con iones de compuestos contaminantes.

La formación de derivados también se pude usar para incrementar las propiedades electronegativas de un compuesto, introduciéndole grupos con gran afinidad por los electrones, como son átomos de halógeno, que se traduce en una mayor sensibilidad y selectividad en el análisis por GC-ECD y por GC/MS en la modalidad NCI.

Los grupos funcionales susceptibles de derivatización, en muchos compuestos y en sus metabolitos, son los grupos hidroxilo, cetona, ácido carboxílico y amino. Existen numerosos reactivos que permiten la derivatización de estos grupos funcionales polares, haciendo factible el análisis por GC y GC-MS. Entre todos los métodos de derivatización posibles, la sililación, acilación y alquilación, han demostrado ser los más versátiles y de uso más extendido.

La formación de derivados sililados combina la estabilidad química y térmica con una gran volatilidad, los derivados son fáciles de preparar y muestran un excelente comportamiento en GC (Segura y col. 1998). La gran versatilidad de agentes sililantes que pueden reaccionar con los distintos grupos funcionales, permite una amplia aplicación en el análisis toxicológico (Polettini, 1998). Otra ventaja de este método de derivatización es que no requiere la evaporación del exceso de reactivo, con lo que se acorta el tiempo de análisis, pero también se acorta la vida media de la columna cromatográfica. Los silil derivados son más sensibles a la hidrólisis que otros derivados que posean los sustituyentes alquilo con más impedimento estérico. La reacción, por tanto, se ha de realizar en condiciones totalmente anhidras, para evitar la hidrólisis.

Los derivados acilados de uso más extendido en el análisis toxicológico son los haloalquilacilados, concretamente perfluoracilados (trifluoracil, pentafluoracil o heptafluoracil), debido a que se incrementa la afinidad electrónica de los compuestos. Otra ventaja adicional es que en los espectros de masas, los iones con mayor abundancia tienen masas muy altas. En estos derivados conviene evaporar el exceso de reactivo, para evitar problemas en el GC. El uso de estos reactivos, por otra parte, puede ocasionar reacciones colaterales debido a las condiciones extremadamente ácidas del medio de reacción. Esta característica hace que estos derivados no sean adecuados para sustancias lábiles en medio ácido.

La metilación es uno de los métodos de alquilación que tiene más aplicaciones en el análisis por GC-MS, debido al aumento pequeño en el peso molecular y a la alta volatilidad de los derivados. Otros reactivos muy usados para derivar grupos carboxílicos son los alcoholes de elevado peso molecular y los que contienen halógeno, ya que los ésteres halogenados, como explicamos anteriormente tienen ventajas cuando se emplean procedimientos especiales de detección como GC-ECD, GC-MS-NCI e incluso GC-MS-MS (Oliveira y col. 1995).

A veces los compuestos a analizar están en forma racémica siendo conveniente su separación, especialmente en casos en los que uno sólo de los isómeros sea farmacológicamente activo. No obstante, aunque tanto la HPLC como la EC son técnicas que permiten esta separación, hay situaciones y grupos específicos de sustancias (anfetamina,

metanfetamina, fenfluramina, metilfenidato, etc.) que requieren una separación por GC. Para ello hay que someterlas previamente a una derivatización quiral.

En cualquier caso en la elección del método de derivatización conviene considerar en primer lugar el modo de ionización que se vaya a emplear. Así para trabajar en NCI conviene obtener los derivados perfluorados, mediante acilación o alquilación; en cambio cuando se aplique el *EI* y se pretenda realizar un análisis cualitativo general, el método de elección será la sililación mediante BSTFA, ya que aunque una de las limitaciones más importantes de la obtención de derivados es la escasez de librerías de espectros de referencia que posean información sobre ellos; afortunadamente la nueva edición de la librería PMW (incluida en los equipos de Agilent) o NIST subsana, en parte, el problema al incluir los derivados de prácticamente todos los compuestos, especialmente los TMS-derivados.

Durante el proceso de derivatización pueden ocurrir efectos secundarios no deseados, como son, entre otros, la formación incontrolada, si las condiciones de reacción no se establecen bien, de derivados minoritarios no deseados, o, si la derivatización es incompleta, de múltiples derivados con compuestos polifuncionales. Estos efectos no deseados pueden afectar la estabilidad de los derivados y al análisis por GC/MS debido a contaminación de la columna, acortando la vida media de la misma, también se producen picos muy anchos en el frente del cromatograma que pueden originar interferencias con los detectores. Consecuentemente estos efectos hay que eliminarlos antes de la inyección. A veces se requiere la evaporación del reactivo de derivatización para evitar una derivatización secundaria en el bloque de inyección.

3.2.5 Cromatografía por Head-space.

A fin de proceder a la identificación y cuantificación de tóxicos volátiles en muestras de sangre u otro medio biológico, se utiliza la cromatografía gaseosa, implementando la técnica de “head space” para separar los analitos de la matriz, previo a la inyección en el cromatógrafo.

Fundamento: a una temperatura dada existe un equilibrio de partición (aire - material biológico) para una sustancia volátil determinada, utilizándose agentes liberadores del tóxico. Luego, el tóxico presente en la fase vapor es analizado por cromatografía gaseosa (CG).

3.2.6 Cromatografía líquida.

La introducción de la cromatografía de gases en la década de 1950 y de la cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), quince años después, dotaron a la química y a las ciencias de la vida con dos poderosas herramientas.

El rápido crecimiento de la cromatografía líquida (1970-1980) ha sido particularmente impresionante en vista de su amplia aplicación, con posibilidad de análisis de compuestos térmicamente inestables, que exhiben baja volatilidad, con altos pesos moleculares y/o amplios rangos de polaridad (Zuccaro y col. 1997; Poletini, 1999).

Una de las contribuciones más significativas al establecimiento de la cromatografía líquida como técnica analítica de rutina fue la introducción de la fase reversa químicamente enlazada, ya que puede ser usada para una gran variedad de compuestos orgánicos, no iónicos, ionizables e iónicos, con la apropiada elección de aditivos en las fases móviles, dentro de las limitaciones de los pKa y de pH.

Además de esta versatilidad, ofrece la posibilidad de inyección de muestras acuosas, considerada inicialmente como una gran ventaja y de distintos sistemas de detección tales como ultravioleta-visible, fluorescencia (natural o formación de derivados pre o post-columna), electroquímico, etc.

Sin embargo dos cuestiones han dificultado su utilidad para el barrido de compuestos en una sistemática toxicológica:

1ª. El requerimiento de establecer una colección de datos de tiempos de retención, ya que en HPLC están influenciados por la reproducibilidad de los mismos (incluso con idénticos materiales de empaquetado), diferencias en parámetros técnicos e instrumentales, tamaño de columna, volúmenes muertos y diferente precisión en los sistemas de bombeo con la consecutiva variación en la composición de la fase móvil o perfil del gradiente (Bogusz y col. 1991).

2ª. La pobre especificidad de una detección a una simple longitud de onda en el ultravioleta-visible, método de detección mas usado (Logan y col. 1990).
Los avances tecnológicos en los equipos, columnas y detectores han mejorado el control de los factores que afectan al comportamiento de la retención y a la reproducibilidad.

A pesar de la buena situación actual de la HPLC en el análisis toxicológico, se siguen presentando problemas que podemos clasificar en:

- Asociados a la instrumentación: presión, fugas, chequeo de válvulas, mezcladores, lámparas del detector etc. Suelen ser simples después de identificarlos, aunque su resolución consume tiempo. Pueden prevenirse con un buen mantenimiento.
- Asociados a la separación propiamente dicha: línea de base, tiempos de retención (cambio de columna, fases móviles, tipo de columna, temperatura...), perfiles de los cromatogramas (colas en los picos, picos fantasmas, negativos, dobles o asimétricos, anchos...), inestabilidad del detector, etc. El síntoma es obvio, suelen ser difíciles de identificar y a veces imposibles de corregir.
- La falta de bibliotecas espectrales para una primera identificación.

En algunos casos se sigue aprovechando la oportunidad de inyección de muestras acuosas o bien la filtración y precipitación directa con disolventes. Sin embargo, la complejidad de los fluidos biológicos y los casos en que bajas concentraciones pueden ser tóxicas, aconsejan extracción, purificación y concentración, bien de forma independiente de la determinación, donde la fase sólida compite con la extracción líquido-líquido, o en linea con el cromatógrafo con pre-columnas para pre-concentración y purificación y posterior envio a la columna analítica (column switching), pre-tratamiento con diálisis etc., que permiten la inyección directa de la muestra sin pérdida de analitos durante pasos críticos como la evaporación. Esto mejora la recuperación, sensibilidad y reproducibilidad.

Respecto a las columnas, la evolución en fases estacionarias de gel de silice (fase normal), quirales o exclusión son patentes, aunque la fase reversa químicamente enlazada sigue siendo la más usada para compuestos de interés en la sistemática toxicológica. La producción de rellenos de fase reversa de alta pureza, libres de metales y desactivados es quizás el más importante desarrollo en este tipo de columnas en los últimos 15 años. Los recientes avances han conseguido una distribución homogénea de la acidez de los grupos silanoles con lo que las columnas son más estables y generan picos reproducibles, agudos y simétricos, sin embargo no llegan a evitar las colas de algunos compuestos básicos que requieren la adición de una base competitiva a bajos pH o la adicción de contraiones (par iónico) para compuestos fuertemente ácidos o básicos.

En general se considera preferible la elución isocrática ya que el comportamiento de la retención es más reproducible, la contribución al fondo por la fase móvil en el espectro de UV-Vis no cambia durante el cromatograma y la cuantificación es más eficaz. Sin embargo para

cubrir el amplio rango de compuestos se requiere de eluciones en gradiente o columnas con diferente fase estacionaria acopladas en serie.

A estas mejoras en la separación se ha unido la generalización del uso del detector de fotodiodos (Diode Array Detector, DAD) que posibilita la obtención de datos del espectro UV durante el tiempo de cromatograma y la detección de impurezas, aplicando el análisis multicomponentes para efectuar análisis cuantitativos válidos independientemente de la resolución o anchura de pico. Es muy versátil y ofrece importantes ventajas, comparado con el detector UV convencional, en el barrido de muestras desconocidas. Otros tipos de detectores (fluorescencia, electroquímico) más sensibles y específicos, no se utilizan en barridos de muestras desconocidas ya que suelen necesitar derivatización y no suelen permitir eluciones en gradiente

El potencial del detector de fotodiodos para picos no resueltos fue un progreso en el análisis de muestras biológicas, de naturaleza muy compleja. Junto con la HPLC ofrece la posibilidad de utilizar la retención cromatográfica como un parámetro de identificación, bien manejando escalas de índices de retención o tiempos de retención relativos con el consecuente intercambio de bases de datos de HPLC-DAD para posibles contactos inter-laboratorios, o unidades de tiempo de retención en usos intra-laboratorio. Esto se ha manifestado en la publicación de numerosos trabajos en que se describen aplicaciones de la HPLC a la detección de un gran número de compuestos y/o sistemática toxicológica general.

Sin embargo, a pesar de las purificaciones cuidadosas ciertas interferencias pueden inducir a resultados falsos positivos o impedir apropiada identificación y cuantificación de los compuestos de interés, además de la conocida limitada especificidad del espectro UV y su variabilidad como función del pH. Por esas razones los toxicólogos han estado esperando el acoplamiento entre HPLC y espectrómetro de masas. La interfase ha sido siempre el punto débil en dicho acoplamiento ya que tiene que eliminar la fase móvil y transformar las moléculas, disueltas en dicha fase móvil, en iones en fase gaseosa, sin degradación térmica. Se han usado diferentes tipos de interfases, analizadores de masas y modos de detección. Sin embargo, la bibliografía más reciente en toxicología analítica se centra en las que utilizan ionizaciones a presión atmosférica, electrospray e ionización química en combinación con detector de espectrometría de masas o tandem masas-masas. Ambas interfases suelen ir instaladas en el mismo instrumento y pueden seleccionarse indistintamente.

Seremos más exigentes con la estabilidad química y aumento del periodo de vida de las columnas. En los últimos años no se aprecia una tendencia clara a implementar columnas de

menor longitud ni diámetro de partícula, a pesar de que se reduciría el uso y coste de disolventes y disminuirían los requerimientos al acoplar el detector de masas.

La combinación de la versatilidad de la separación por HPLC con la selectividad de la detección por espectrometría de masas, con interfases a presión atmosférica, tendrá que salvar los obstáculos que todavía limitan su aplicación, especialmente en lo que respecta a la reproducibilidad de los espectros de masas, condiciones de ionización estandarizadas, y estudios sistemáticos, decisivos para ser técnica de identificación en toxicología. Otro factor limitante es su alto costo de adquisición y mantenimiento aunque bajará e indudablemente se harán mas pequeños y de mas fácil manejo. Sin embargo su introducción en el análisis toxicológico ha abierto nuevas perspectivas de determinación simultánea de grupos de compuestos no derivatizables y metabolitos polares

En la actualidad ninguna técnica instrumental es autosuficiente para el barrido de todos los compuestos, es por ello que asistiremos a la generalización de acoplamientos, quizás en algunos casos sofisticados, entre ellas, lo que ya supone nuevas estrategias analíticas.

3.3 Analitica del estudio de tóxicos fijos.

La espectrofotometría de absorción atómica es el procedimiento más empleado en la determinación de elementos traza en medios biológicos. Existen cuatro modalidades: llama, cámara de grafito, vapor frío y sistema de hidruros volátiles. La modalidad de llama es adecuada para la medida de elementos en alta concentración. La atomización electrotérmica o cámara de grafito (EAAS) es la idónea para el análisis de elementos en muy bajas concentraciones. El sistema de hidruros volátiles (SHV) se aplica con gran efectividad para conseguir volatilizar algunos metales en forma de hidruros (As, Se, Sb, Ti, etc.), y con el sistema de vapor frío obtener mercurio atómico. Esto a su vez, proporciona un medio para aislar al elemento de la matriz de la muestra, con lo cual se consigue mayor sensibilidad y disminución de las interferencias. Los procedimientos analíticos por este sistema en medios biológicos son innumerables.

3.3.1 Analítica de los tóxicos orgánicos no volátiles o Tóxicos Orgánicos Fijos.

Bajo la denominación de Tóxicos Orgánicos Fijos **(TOF)** o no volátiles se incluye una gran variedad de sustancias orgánicas, de interés toxicológico, que no pueden aislarse por

destilación de las matrices que los contienen, sino que debe recurrirse a la acción de disolventes orgánicos (en medio ácido o alcalino) para su separación y posterior identificación.

La mayoría de estos tóxicos sufren profundos cambios metabólicos en el organismo y, en consecuencia, pueden aparecer en los fluidos o tejidos en su forma original o como productos de biotransformación (metabolitos), libres o conjugados con diferentes compuestos (ácido glucurónico, sulfatos, aminoácidos, etc.). Las propiedades físico-químicas del tóxico y sus metabolitos pueden ser muy distintas, a veces incluso entre los metabolitos de un mismo compuesto. Ello determina una excreción característica según los casos y la conveniencia de realizar la investigación en una u otra matriz (orina, sangre, bilis, etc.).

Frecuentemente la especie que será analizada está presente en un tejido o un fluido biológico, unido a proteínas u otros constituyentes celulares. En este caso, puede ser necesario separar el tóxico (el compuesto madre o sus metabolitos) del resto de los componentes de la matriz, de modo de obtenerlo en cantidad y pureza suficientes para permitir su identificación y cuantificación. Sólo recientemente han surgido métodos disponibles que permiten la medida directa de algunos analitos sin la separación previa de su matriz.

El analista toxicólogo ha experimentado un crecimiento paulatino en el número de técnicas a su disposición. En la actualidad la clásica metodología convencional ha sido reemplazada por la introducción de métodos instrumentales más sofisticados, de gran sensibilidad y precisión pero cuyo costo elevado limita su disponibilidad en la mayoría de los laboratorios de nuestro medio.

Los TOF tienen en común el uso de metodologías similares para su aislamiento, caracterización y cuantificación. En este capítulo se describirá someramente el fundamento de los equipos empleados en su investigación de acuerdo con el siguiente esquema:

Métodos Inmunológicos	**Métodos Cromatográficos**
(RIA, ELISA, FPIA, AMIA)	(TLC, HPTLC, GC, HPLC, GC/MS, HPLC/MS)
↓	↓
Se aplican directamente sobre la matriz.	Requieren separar previamente el analito de la matriz, mediante:
	↙ ↘

extracción líquido – líquido|extracción en fase sólida (ampolla de decantación, columnas SPE)
tierra de diatomeas)

A)- INMUNOENSAYOS.

Existen en el comercio numerosos tipos de inmunoensayos con aplicaciones en Toxicología. En su mayoría están diseñados para el análisis de muestras líquidas, como orina, agua y suero debido a que estas matrices presentan poca cantidad de interferencias. Estas muestras se emplean en forma directa, evitando por lo tanto el paso previo de extracción o aislamiento de los analitos y logrando una reducción importantísima en el tiempo de obtención de los resultados (10 minutos – 1 hora).

Los inmunoensayos se basan en la reacción específica que se produce cuando un antígeno se enfrenta con un anticuerpo. La técnica tradicional consiste en mezclar un volumen de muestra conteniendo la droga a ensayar, con una cantidad fija de un anticuerpo específico (monoclonal o policlonal), y una cantidad fija de la misma droga marcada sintéticamente con un radioisótopo, una enzima activa o una sustancia fluorescente, por ejemplo. De este modo se establece una competencia entre la droga marcada (*Droga**) y la presente en la muestra (*Droga*) por los sitios de unión del anticuerpo. En forma simple se esquematiza esta competencia:

Droga* + Droga + Anticuerpo ⟹ Droga*-Anticuerpo + Droga –Anticuerpo

La probabilidad de que una molécula marcada o sin marcar se una al anticuerpo depende de su concentración. Se requieren instrumentos capaces de evaluar el punto final de la reacción y comparar la respuesta del test contra estándares conocidos. De acuerdo al tipo de marca es el método analítico de medida empleado.

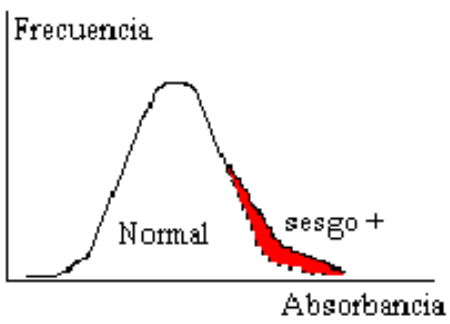
En algunos casos no puede diferenciarse la señal producida por la droga marcada unida al anticuerpo y la droga macada libre, siendo necesario separarlas antes de efectuar la medida. Estos ensayos se conocen como *heterogéneos*, e involucran principalmente a los radioinmunoensayos.

Cuando esta separación no es necesaria, porque la señal producida por la droga marcada se diferencia si está libre o unida, el ensayo se llama *homogéneo.*Esta diferencia ocurre porque la señal es suprimida, alterada o producida en la unión con el anticuerpo. Los inmunoensayos ópticos (donde la señal medida es un cambio óptico, como absorbancia UV, fluorescencia o

luminiscencia) pertenecen a este tipo. Pero esta ventaja se logra a costa de una menor sensibilidad debido a que la señal óptica es medida en presencia del fluido biológico original. Para aumentar la sensibilidad se crearon inmunoensayos ópticos heterogéneos.

Es importante definir dos parámetros para los ensayos inmunológicos: la sensibilidad y el límite de detección. La **sensibilidad del ensayo** es el cambio en la respuesta por cada cambio en la cantidad de reactante. En un gráfico de dosis respuesta, la sensibilidad es la pendiente de la curva en un punto determinado; debido a que muchas veces las curvas dosis-respuesta son sigmoideas, la sensibilidad no es constante. El **límite de detección** se define como la mínima cantidad de inmunorreactante que puede detectar el sistema.

Un elemento esencial es establecer el valor de discriminación entre una muestra positiva y una muestra negativa. Este valor se denomina valor de corte o "cut-off". En los inmunoensayos, los sueros negativos muestran un comportamiento que se asemeja a una distribución normal, pero presentan un sesgo positivo o tendencia [illegible] s mas altos que los esperados si siguieran una distri[illegible]



Puede calcularse el desvío standard, DS, como:

$$(DS)^2 = \frac{\sum(X_i - m)^2}{n - 1}$$

n: nº de sueros negativos analizados
m: media aritmética
X_i: absorbancia de cada suero

Otro aspecto es la confiabilidad de un resultado, ya sea positivo o negativo. Para muestras positivas se define la **sensibilidad** como la habilidad de un ensayo de mostrar como positiva a una muestra que realmente es positiva (este término no debe confundirse con la "sensibilidad del ensayo " definida anteriormente). La **especificidad** es la habilidad del ensayo de mostrar como negativa a una muestra que realmente es negativa. En términos matemáticos se pueden escribir como:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{positivos en el ensayo}}{\text{positivos en el ensayo + falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{negativos en el ensayo}}{\text{negativos en el ensayo + falsos positivos}} \times 100$$

Los positivos en el ensayo son las muestras positivas que el ensayo detecta como positivas. Los falsos negativos son las muestras que en realidad son positivas pero que el ensayo muestra como negativas. Los negativos en el ensayo son las muestras negativas que el ensayo detecta como negativas y los falsos positivos son las muestras que en realidad son negativas pero que el ensayo detecta como positivas. Obviamente, es necesario disponer de un lote de muestras positivas y negativas conocidas para calcular estos parámetros.

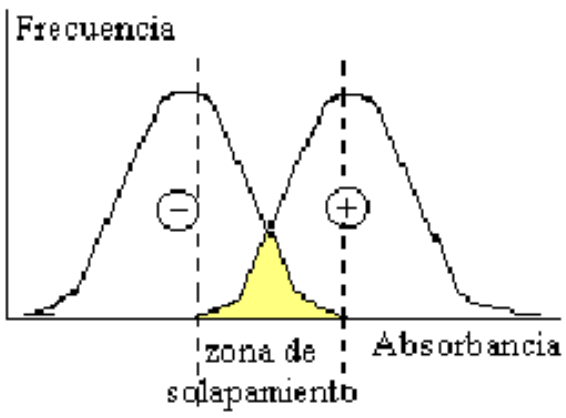
La **confiabilidad** en el positividad: C(+) es la probabilidad de que una muestra detectada como positiva por el ensayo sea realmente positiva. Del mismo modo la confiabilidad en la negatividad, C(-) es la probabilidad de que una muestra que el ensayo detecta como negativa sea realmente negativa. En términos matemáticos se puede escribir como:

$$\text{Confiabilidad (+)} = \frac{\text{positivos en el ensayo}}{\text{positivos en el ensayo + falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Confiabilidad (-)} = \frac{\text{negativos en el ensayo}}{\text{negativos en el ensayo + falsos negativos}} \times 100$$

A modo de ejemplo, si en 1000 muestras 20 son positivas, y el ensayo posee una sensibilidad del 90 % significa que el ensayo detectará como positivas a 18 de las 20 muestras (2 son falsos negativos). Si además se sabe que la especificidad del ensayo es del 90% significa que detectará 882 como negativas (98 falsos positivos). Luego la C(+) = 15,5% y la C(-)= 99,8%. Si en cambio de 1000 muestras 300 fueran positivas, el mismo ensayo tendría una C(+)= 79,4% y una C(-)=95,5%.

El valor de corte o **cut off** del sistema debe elegirse de modo tal que minimice los resultados falsos, ya sean positivos o negativos. En muchos casos existe una zona de solapamiento en donde no puede establecerse con certeza si una muestra que cae en esa zona es negativa o positiva; en estos casos se elegirá un valor de corte de manera tal de tener más falsos positivos o falsos negativos, según que tipo de error produzca consecuencias menos graves.



Se puede establecer el valor de corte como la reactividad media de los sueros negativos (Absorbancia, miliV, etc) más 2 o 3 DS.

Los test de screening empleados para la búsqueda de drogas en Toxicología se caracterizan por elegir un valor de corte tal que no se produzcan falsos negativos. Es por eso que los resultados positivos deben ser confirmados por otras técnicas.

Los ensayos inmunológicos de mayor uso en Toxicología son aquellos destinados a la búsqueda de drogas de abuso y algunos fármacos en orina (opiáceos, cocaína, benodiazepinas, anfetaminas, dextropropoxifeno, fenciclidina, metadona, barbitúricos, tetrahidrocannabinol, ácido lisérgico, antidepresivos tricíclicos, etc.). También aquellos que permiten la cuantificación de etanol en sangre, el monitoreo de algunas drogas terapéuticas en plasma (ciclosporina, metotrexato, difenilhidantoína, fenobarbital, carbamazepina, ácido valproico, digoxina, teofilina, paracetamol, etc.) Otros compuestos analizados son ciertos plaguicidas en agua y suelo (endosulfan, carbofurano, aldicarb, endrin, dieldrin). Se utilizan también para la determinación semicuantitativa de micotoxinas en alimentos (aflatoxinas, zearalenona y ocratoxina) e incluso la actividad de algunas enzimas como la acetilcolinesterasa.

La sensibilidad de los inmunoensayos ópticos es comparable a la de Cromatografía Gaseosa. Sin embargo la especificidad es menor, ya que pueden existir reacciones cruzadas de los anticuerpos empleados, con sustancias que posean una estructura química similar a la del analito en cuestión. Además, como ciertos anticuerpos están destinados a la determinación de familias de fármacos, debe tenerse en cuenta que no todos los compuestos incluidos en la misma familia tendrán la misma reactividad con el anticuerpo.

Los marcadores generalmente empleados en nuestro medio son:

- Isótopos radiactivos (**RIA**: Radioimmunoassay)
- Enzimas (**ELISA**: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, **EMIT**: Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)
- Sustancias Fluorescentes (**FPIA**: Fluorescence Polarization Immunoassay)
- Oro Coloidal (**AMIA**: ASCEND MultImmunoassay)

De todos ellos el RIA posee el mayor límite de detección (del orden del picogramo / mililitro). Sin embargo posee algunas desventajas que han llevado a su reemplazo por alguno de los demás inmunoensayos (cuyos límites de detección están en el orden de los nanogramos / mililitro). Los reactivos empleados en el RIA son de corta vida media, por ejemplo un trazador radiactivo marcado con yodo tiene una vida media de 60 días, mientras que un conjugado enzimático usado en ELISA suele conservarse en buen estado durante años. Además se corre el riesgo de contaminación producida por el manejo de isótopos radiactivos.

Los radioinmunoensayos (RIA, RRA) fueron los primeros en desarrollarse. Sin embargo, son los que presentan más problemas de manipulación ya que se trabaja con isótopos radiactivos que presentan una serie de riesgos para la salud además de producir una serie de desechos radiactivos que hay que eliminar apropiadamente. Por ello, a pesar de su gran sensibilidad se han visto desplazados por los enzimoinmunoensayos y por los inmunoensayos de fluorescencia.

El fundamento del análisis por radioinmunoensayo (RIA) es la competencia entre el antígeno sin marcar por el sitio de un anticuerpo que puede estar ocupado por un antígeno marcado radiactivamente, seguida por la separación de los antígenos unidos y libres y la medida de sus concentraciones. La probabilidad que una molécula marcada o sin marcar se una al anticuerpo depende de su concentración. Se puede construir una curva de dilución isotópica mediante la adición de cantidades cada vez mayores del compuesto sin marcar, manteniendo constante la concentración del antígeno marcado. La concentración del compuesto se determina a partir de la curva de calibrado construida. Se trata de un inmunoensayo heterogéneo por lo que antes de realizar la medida de radiactividad hay que separar el complejo Ag-Ac sin marcar del Ag libre y del complejo Ag-Ac sin marcar.

Este método se utiliza en la determinación de los metabolitos urinarios de morfina, capaz de diferenciar entre codeína, morfina glucurónido y morfina, cocaína, buprenorfina y digoxina. La principal desventaja del RIA es que para realizar el análisis de varias sustancias habría que realizar tantos análisis como sustancias que se quieran determinar.

Los enzimoinmunoensayos mas difundidos son el ELISA (Enzyme linked inmunosorbent assay) y el EMIT (Enzyme multiplied inmunoassay technique). El ELISA es un inmunoensayo enzimático competitivo y heterogéneo. La actividad enzimática se mide por la conversión catalizada enzimáticamente de un compuesto incoloro o no fluorescente en uno coloreado o fluorescente. Tiene el mismo fundamento que el RIA pero no utiliza marcadores radiactivos.

Se desarrollaron varios inmunoensayos para la determinación de algunos plaguicidas en agua y suelo (endosulfan, carbofurano, aldicarb, endrin, dieldrin), para drogas de abuso (barbitúricos, benzodiazepinas, anfetamina, metanfetamina, morfina, opiáceos, metabolitos de la cocaína, fenciclidina y LSD) en sangre y suero. La sensibilidad y especificidad de estos enzimoinmunoensayos son similares a los obtenidos por RIA.

El EMIT es la técnica de inmunoensayo con mayor aplicación en el análisis de fármacos o drogas de abuso. Los ensayos EMIT están basados en la unión competitiva a proteínas, pero

no requiere el uso de radioisotópos y tampoco la separación de las fracciones libres y unidas antes de realizar las medidas de actividad enzimática. Se trata, por tanto, de un inmunoensayo enzimático competitivo homogéneo en el que se mide la absorbancia a 340 nm de la reacción producida por el paso de NAD a NADH, que es el cofactor necesario para que la enzima glucosa-6P-deshidrogenasa actúe sobre su sustrato.

Los ensayos de EMIT se diseñaron originalmente para el análisis de muestras de orina, pero posteriormente se han desarrollado algunos reactivos para suero. No hay que someter a dichas muestras a ningún tratamiento previo antes de analizarlas mediante este inmunoensayo. No requiere realizar la hidrólisis previa en muestras de orinas dado que el anticuerpo marcado reacciona con los glucurónidos de las drogas. Actualmente es un técnica fácil y rápida de realizar y está automatizada. La sensibilidad de esta técnica es similar a la cromatografía gaseosa, sin embargo su especificidad es menor ya que pueden aparecer reacciones cruzadas de los anticuerpos empleados en el análisis con sustancias que posean una estructura química similar a la del analito en cuestión. Además, como ciertos anticuerpos están destinados a la determinación de familias de fármacos, hay que tener en cuenta que no todos los compuestos incluidos en la misma familia tendrán la misma reactividad con el anticuerpo.

La aplicación de los ensayos de ELISA, FPIA y AMIA se describe en detalle en el capítulo correspondiente a Psicofármacos y otras drogas medicamentosas.

B)- TÉCNICAS CROMATOGRAFICAS

La búsqueda de TOF mediante técnicas cromatográficas, como **TLC** (Thin Layer Chromatography), **HPTLC** (High Performance Thin Layer Chromatography), **HPLC** (High Pressure Liquid Chromatography), **GC** (Gas Chromatography), etc. se caracteriza porque antes de aplicarlas es necesario separar las drogas de la matriz en la que se encuentran inmersas mediante alguna técnica de extracción. En la práctica esto se logra siguiendo una serie de pasos, como los que se describen a continuación.

1- Preparación de la muestra: es un paso crucial en los análisis. Involucra la homogenización de la muestra, ajustes de pH, pesaje, procedimientos de hidrólisis (ácida, básica o enzimática), precipitación, centrifugación, etc. de modo tal que se facilite el aislamiento de la sustancia de interés.

2- Aislamiento del analito: se puede llevar a cabo mediante extracción líquido-líquido (en tubos, en ampollas de decantación o en columnas de tierra de diatomeas) o extracción en fase

sólida (columnas de SPE) de acuerdo a las disponibilidades del laboratorio. En este paso se remueve el analito de su matriz original para obtenerlo en la mayor concentración posible, estabilizarlo (ya que en su matriz original puede degradarse química o enzimáticamente) y eliminar interferencias.

3- Concentración del extracto: el objetivo de este paso es colocar el analito en el menor volumen posible para aumentar la sensibilidad del análisis. Se deben usar condiciones controladas, idealmente una temperatura menor de 40ºC y corriente de nitrógeno.

Durante las operaciones antes mencionadas se debe tener sumo cuidado para evitar pérdidas por volatilización, oxidación o absorción en los precipitados, ya que frecuentemente los productos a identificar están presentes en cantidades menores del μg/ ml. Las pérdidas por volatilización de sustancias básicas como anfetaminas puede prevenirse cuidando la temperatura y salificando el extracto con ácido clorhídrico al 1 % en metanol.

4- Identificación del analito: existen diferentes niveles de complejidad dependiendo de las técnicas que se utilicen para su identificación. Así existe un ~~nivel primario~~ que utiliza técnicas como Cromatografía en Capa Delgada (TLC), Espectrofotometría UV, además de reacciones de coloración para la orientación, etc. Un nivel secundario involucra técnicas tales como la Cromatografía de Gases (GC) y la Líquida de Alta Resolución (HPLC) tanto para Screening como para la determinación de una droga en particular y un nivel terciario que utiliza la Espectrometría de Masas acoplada a un a Cromatografía separativa como la de Gases o Líquida de Alta Resolución (GC/MS o HPLC/MS).

5- Cuantificación del analito: una vez identificado el analito la cuantificación del mismo se puede realizar por una técnica directa, bien ajustada y utilizando patrones de referencia puros para análisis. Esta técnica directa generalmente es una técnica cromatográfica gas-líquido o líquido-líquido y la espectrometría acoplada a estas dos anteriores.

Cada uno de estos pasos merece un capítulo aparte dentro de la Toxicología. Por ende sólo se pretende citar sus características principales haciendo hincapié en los detalles técnicos más relevantes.

3.3.2 Acondicionamiento de la Muestra.

El primer paso en las técnicas de análisis de TOF consiste en la homogeneización de la muestra por simple agitación del recipiente que la contiene. La turbidez que presentan muchas

muestras de orina podría causar una serie de problemas en los pasos posteriores, como el taponamiento de columnas de extracción o la interferencia en métodos inmunológicos. Es por ello que, luego de la homogeneización, es conveniente centrifugar o filtrar las muestras. En general, no se aconseja descartar los precipitados debido a la posibilidad de adsorción de algunas drogas.

En el caso de muestras de sangre entera o plasma varias técnicas recurren a la desproteinización de las mismas mediante el empleo de sales (sulfato de amonio y tungstato de amonio), ácidos (ácido tricloroacético) o solventes orgánicos (acetona, acetonitrilo, metanol y etanol). La finalidad de este paso es romper la unión proteína – droga y evitar además el taponamiento de los sistemas de extracción en ampolla o columna, por la formación de agregados de proteínas desnaturalizadas. En caso de recurrir a cambios drásticos de pH se debe considerar la estabilidad de algunas drogas (benzodiazepinas e.g).

Luego, el requisito más importante para extraer los analitos con solventes orgánicos es el ajuste de pH. Es necesario mantener los ácidos y bases débiles en su forma no disociada (no ionizada) para favorecer su pasaje desde la matriz acuosa, en la que generalmente se encuentran, a la fase orgánica. Con este fin, para la extracción de ácidos débiles se acidifica la muestra (con HCl 25% por ejemplo) hasta a un pH: 2-3 mientras que para la extracción de bases débiles se busca un pH: 8 – 8,5 con bicarbonato de sodio, mientras que las bases fuertes se extraen a pH mayor de 9 (por ejemplo, con NaOH 30% o NH_3 concentrado).

El conocimiento del metabolismo de las drogas permite mejorar el aislamiento de varias que, se sabe, se eliminan por orina conjugadas con ácidos glucurónico o sulfúrico. Tal es el caso de las benzodiacepinas, metacualona, fenotiazinas, morfina, codeína y cannabinoides. En la búsqueda particular de alguna de estas sustancias es imprescindible llevar a cabo una hidrólisis química (ácida o alcalina) o enzimática (beta glucuronidasa y/o aril sulfatasa) de la orina. En este último caso es de suma importancia respetar las condiciones de pH, temperatura y tiempo en el cual la enzima desarrolla su máxima actividad, de acuerdo a la marca comercial utilizada.

3.3.3 Métodos de Extracción.

3.3.3.1 Extracción en Ampolla de Decantación.

La ampolla de decantación es el sistema clásico para realizar extracciones. En ella se ponen en contacto una muestra (generalmente acuosa) y un solvente de extracción (generalmente orgánico y liposoluble) elegido de manera tal que los componentes buscados

tengan la máxima solubilidad posible en él. Ambas fases deben ser inmiscibles entre sí y presentar distinto peso específico para que se separen fácilmente en dos capas. La distribución (partición) de un analito entre 2 líquidos inmiscibles está representada por el equilibrio:

$[A]_o \longleftrightarrow [A]_{aq}$ Donde $[A]_o$: concentración del analito en fase orgánica y $[A]_{aq}$: concentración del analito en fase acuosa

La partición está dada por la relación de concentraciones del analito en ambas fases. Es decir:

$$P = \frac{[A]_o}{[A]_{aq}}$$

siendo P el coeficiente de partición de actividades de A. Depende del solvente orgánico, de la temperatura y para solutos ionizables del valor del pH del medio acuoso.

Las sustancias neutras de características no polares pueden extraerse directamente desde sistemas acuosos a orgánicos, mientras que, las sustancias con características ionizables, requieren la supresión de su disociación modificando el valor del pH del medio. Por ello los analitos ácidos se extraen después de la acidificación de la muestra y los básicos después de su alcalinización.

El proceso consiste simplemente en agitar manualmente durante 30 segundos-1 minuto la mezcla y luego dejar separar las fases por decantación por efecto de sus pesos específicos.

Este método de extracción en ampolla presenta serias desventajas:

- durante la agitación con disolventes orgánicos se forman fácilmente emulsiones que dificultan la separación de fases ocasionando considerables pérdidas de las sustancias buscadas, requiriendo la centrifugación para terminar la emulsión.
- en cada extracción se recupera, aproximadamente, sólo el 70 % del analito buscado. Es decir, se necesitan tres extracciones para recuperar 97,3% del analito, pero ello significa un consumo de solvente 3 veces mayor además de aumentar el tiempo de análisis.
- el extracto obtenido debe secarse (con sulfato de sodio anhidro) para eliminar restos de fase acuosa, antes de proceder a su concentración por evaporación.
- las impurezas presentes en la matriz se reducen, pero no se eliminan totalmente y permanecen en el extracto final.

En resumen, la pérdida de analitos debido a la pobre recuperación sumado al alto consumo de solventes de extracción, junto con otras muchas razones como practicidad y rapidez de operación, hacen que las ampollas de decantación se vean seriamente reemplazadas por los sistemas de extracción en columna.

3.3.3.2 Columnas de Extracción Líquido – Líquido.

El paso de extracción puede simplificarse usando columnas de tierra silícea. Estas columnas basan su funcionamiento en la partición líquido-líquido. El relleno consiste en tierra silícea, de estructura granular y gran volumen de poro. La columna queda cerrada en el extremo superior por una cestilla provista de una hoja de papel de filtro y en el extremo inferior, por papel de filtro. La velocidad de elución se controla mediante una cánula colocada sobre la boca cónica de salida. (Fig. 3.2)

Fig. 3.2
Columnas
Extrelut NT

El procedimiento consiste en aplicar una muestra acuosa en la columna, la cual pasa a ser la fase estacionaria distribuida dentro los poros del relleno. Aproximadamente el 90 % del volumen de relleno queda humedecido, mientras que el 10% restante se mantiene seco y activo en la parte inferior de la columna, destinado a secar el eluato.

Luego de 15 minutos de espera para lograr el acondicionamiento de la columna, se añade un solvente orgánico inmiscible con el agua. La fase acuosa se mantendrá fija sobre el soporte mientras que todas las sustancias lipofílicas serán extraídas de la fase acuosa a la orgánica.

Es decir, en la primera parte del relleno (90%) los analitos de interés se solubilizan en la matriz polar acuosa de la muestra, pero como tienen baja o a lo sumo mediana polaridad, su

retención física en los poros es mucho menos firme que la de moléculas interferentes más polares del resto de la matriz.

Al añadirse el solvente orgánico, arrastra a los analitos hacia abajo, debido a su afinidad con ellos. Este flujo enriquecido en las sustancias de interés, encuentra la segunda porción (10%) de poros de tierra silícea aún secos. Debido a estos poros aún activos, cambia la relación de velocidades de elución de los distintos componentes: las moléculas polares (entre ellas el agua y gran parte de las impurezas) son atraídas con gran fuerza, y se adhieren a los poros por adsorción; mientras que los analitos de interés continúan su avance hacia abajo junto al solvente de extracción, recuperándose con un rendimiento del 90% o más. Gracias a este último paso, el eluato obtenido se encuentra libre de humedad y puede evaporarse directamente sin necesidad de una etapa de secado previa a su concentración.

Esta técnica ofrece importantes ventajas en comparación con la extracción en ampolla de decantación en la cual, como se mencionó anteriormente, es necesario recurrir a varias agitaciones para proceder a una extracción cuantitativa, la fase orgánica debe secarse y a continuación concentrarse. En cambio en estas columnas:

- las muestras no necesitan ser agitadas durante las extracciones evitándose la formación de emulsiones y por ende la pérdida de analitos.
- el eluato no requiere un secado previo al proceso de concentración,
- el extracto obtenido contienen un bajo número de impurezas, tales como pigmentos urinarios, lípidos y otros compuestos metabólicos que podrían dificultar el análisis, especialmente si sólo hay trazas de la sustancia buscada (nanogramos),
- se logra una extracción cuantitativa, con una recuperación del 90% o más, en un solo paso lo cual implica un importante ahorro de disolventes orgánicos, con reducción de los costos,
- la elución transcurre automática y rápidamente disminuyendo notablemente el tiempo en los análisis, sobre todo cuando se trabaja con muchas muestras simultáneamente,
- se puede efectuar una extracción secuencial a valores de pH diferentes en dos etapas,
- se admite la posibilidad de automatización o robotización para realizar las extracciones,
- es posible transportar la columna con la muestra aplicada para realizar un análisis diferido.

En resumen, en corto tiempo se obtendrán eluatos de gran pureza con altos porcentajes de recuperación y por ende muy buena sensibilidad analítica. Sin embargo, el empleo de estas columnas tiene ciertas limitaciones. Por ejemplo, los interferentes polares son eliminados fácilmente, pero no pueden eliminarse los componentes de menor polaridad que la de los analitos de interés, los cuales pasarán indefectiblemente al eluato.

Además, debido a las características de su relleno posee un campo limitado de aplicación en la búsqueda de drogas de cualquier constitución. Prácticamente, por su funcionamiento, casi no tiene en cuenta el distinto grado de ionización de los analitos durante las extracciones, causados por cambio de pH o fuerza iónica, con lo cual se pueden modificar las retenciones a voluntad en los sistemas de extracción en fases sólida (SPE) que se describen a continuación.

3.3.3.2 Columnas de Extracción en Fase Sólida (SPE).

Las columnas de SPE (Fig. 3.3) permiten aislar compuestos de interés a partir de una matriz biológica compleja o que contiene sustancias interferentes, en alto grado de pureza y con un alto porcentaje de recuperación. Sin embargo el principio de extracción es muy diferente al de las columnas con tierra de diatomeas.

Las columnas de SPE contienen un empaquetamiento de silica químicamente enlazada a distintos sustituyentes, de modo tal que se aprovechan las interacciones polares, no polares o basadas en intercambio iónico entre los componentes de la muestra, el adsorbente sólido y el eluyente apropiado.

Las columnas se elaboran en polipropileno para asegurar su inercia química. En su parte inferior se coloca el relleno, comprimido suavemente entre dos fritados de micro-fibra de vidrio, químicamente inertes. En su parte inferior la columna se estrecha, ajustándose en el adaptador individual que forma parte de la tapa del sistema extractor.

Fig. 3.3
Columnas SPE.

Un sistema extractor clásico (Fig. 3.4) consta de una cámara de vidrio transparente de forma rectangular, con tapa que permite asegurar el vacío en el interior del sistema. En uno de los costados lleva un tubo de salida, una válvula de regulación de vacío y un manómetro.

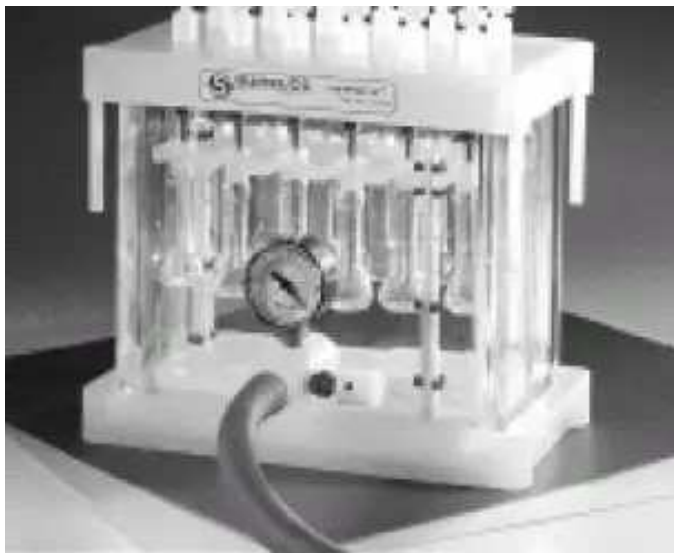


Fig. 3.4: cámara de vacío para SPE.

Cuando toda la muestra se encuentra en el interior de la columna se realiza el lavado para que termine de eluir la matriz; fuera del relleno se observa sólo el solvente de lavado. La elución selectiva del primer grupo de analitos se colecta en un vial. Luego se cambia el vial y se procede a la segunda elución selectiva, con una nueva mezcla de solventes de pH y polaridad adecuados.

La extracción en fase sólida está cada vez más extendida, pues proporciona una extracción más rápida y selectiva y requiere menores volúmenes de disolvente orgánico. La utilización de sílice ligada para la extracción de muestras parte de su empleo en HPLC.

La extracción en fase sólida es una técnica cromatográfica que implica la partición de compuestos entre una fase sólida y una fase líquida, debiendo el compuesto a extraer tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra y al mismo tiempo ser fácilmente extraible por un pequeño volumen de disolvente. Una típica secuencia de extracción incluye acondicionamiento, aplicación de la muestra, lavado y finalmente elución del analito.

La mayoría de las fases ligadas disponibles comercialmente son tipo siloxano, se preparan por reacción de los grupos silanoles libres del gel de sílice microparticulado con un modificador, lo que ha permitido desarrollar distintos tipos de fases estacionarias que pueden clasificarse según el grupo funcional en apolares, polares o de intercambio iónico.

A finales de los 80 se desarrollaron las llamadas fases de función mixta, en las que parte de los grupos silanoles se han hecho reaccionar con cadenas alquílicas de longitud intermedia y

otra parte con sustituyentes que permiten el intercambio catiónico, por lo que se pueden dar interacciones de tipo polar y apolar.

La aparición de este tipo de columnas ha permitido que la extracción en fase sólida, que en principió se utilizó únicamente para la extracción de compuestos concretos o familias de compuestos, se esté aplicando de forma generalizada en la sistemática analítica toxicológica de todo tipo de muestras. Las fases mixtas son capaces de retener a un pH adecuado a las sustancias ácidas y neutras por interacciones hidrofóbicas con las cadenas alquílicas y a las sustancias básicas por interacciones con los grupos de intercambio catiónico. La elución diferencial se lleva a cabo por el ajuste adecuado de pH y la elección correcta del disolvente. En caso de muestras especialmente sucias se pueden utilizar secuencialmente dos columnas, con fases iguales o diferentes, para primero eliminar interferencias como grasas o pigmentos biliares y proceder después a la extracción propiamente dicha.

Los factores críticos a tener en cuenta al afrontar una extracción en fase sólida una vez establecido el procedimiento son el ajuste del pH, la velocidad de flujo en las distintas etapas y el control de los tiempos de secado. También hay que tener en cuenta que pueden existir variaciones en la manufactura de las columnas de un mismo o diferente lote comercial, que puede ser la causa de variaciones en los rendimientos. De ahí la importancia del empleo de un estándar interno adecuado (Bogusz y col. 1996).

Recientemente se ha dado un paso más en la extracción en fase sólida, son los discos de extracción en fase sólida, cuya principal ventaja es la reducción en el volumen de muestra y de disolvente. Se han publicado los primeros trabajos sobre la aplicación de estos discos a la sistemática analítica toxicológica de muestras de orina con resultados satisfactorios (de Zeeuw y col. 2000).

La extracción por head-space consiste en inyectar directamente en el cromatógrafo de gases la muestra tomada de la cámara de aire de un vial herméticamente cerrado donde se ha colocado la muestra. Es únicamente aplicable a compuestos volátiles y no consigue concentrar la muestra, pero es altamente selectiva y la manipulación de la muestra es mínima, requiriendo sólo un simple calentamiento o la adición de una sustancia que favorezca la volatilización. Esta es la técnica de elección para el análisis de tóxicos tan importantes como el etanol, metanol o monóxido de carbono, pero no es aplicable a la sistemática analítica toxicológica.

Una modalidad con grandes perspectivas es la microextracción en fase sólida, que podría considerarse como una combinación entre el head-space y la extracción en fase sólida. En un principio se utilizó únicamente para la determinación de compuestos volátiles en aguas, hoy en día su aplicación se ha extendido a todo tipo de muestras, incluso sólidas, y para

compuestos con distinto grado de volatilidad (Santos y col. 1996, Nagasawa y col. 1996, Jinno y col.1996, Moder y col. 1997, Chen y col. 1997, Jurado y col. 2000).

En la microextracción en fase sólida los analitos son adsorbidos directamente desde la muestra a una fibra de sílice fundida ligada químicamente con la fase estacionaria apropiada. La fibra está incluida en el émbolo de una jeringa especial. Para que se produzca la adsorción la fibra entra en contacto con la muestra, directamente o con el espacio en cabeza, durante el tiempo adecuado y a la temperatura que se establezca como óptima. Los analitos se desorben térmicamente en el bloque de inyección del cromatógrafo de gases o en una interfase que permita la elución de los analitos por la aplicación de la fase móvil. Esta conexión con la cromatografía líquida de alta resolución abre el campo de aplicación de este tipo de extracción.

Aunque hoy en día su aplicación se limita a familias concretas de compuestos, mencionaremos también la extracción por inmunoadsorción. Se basa en la interacción selectiva entre el anticuerpo y el analito por lo que permite una extracción altamente selectiva, aumentando la sensibilidad y la recuperación. No es necesario el pretratamiento de la muestra para la liberación de los conjugados y permite la inyección directa en HPLC

3.3.3.3- Concentración del Extracto.

Los extractos obtenidos por cualquiera de los procedimientos antes descriptos, deben ser reducidos a un volumen menor, para aumentar la concentración de los analitos presentes, e incluso llevados a sequedad para redisolverlos posteriormente en un solvente más adecuado según la técnica de identificación que se seguirá. Esta operación requiere que los analitos sean estables térmicamente y que no se volatilicen junto con el solvente. El método usual consiste en colocar los viales en placas calefactoras (temperatura menor de 40 ºC) y bajo corriente de nitrógeno. El método de elección es la utilización de la evaporación a presión reducida en rotavapor, lo que permite eliminar el solvente a bajas temperaturas (40 °C).

4- Identificación y Cuantificación mediante Cromatografía.

Según la IUPAC, la cromatografía es un método usado para la separación de los componentes de una muestra, mediante su distribución en dos fases: estacionaria (FE) y móvil (FM). La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido retenido sobre un soporte sólido. La fase móvil puede ser un gas o líquido (o un fluido supercrítico). En base a la FM los sistemas cromatográficos se dividen en:

- de Fase Gaseosa, internacionalmente GC (Gas Chromatography) y

- de Fase Líquida, denominados LC (Liquid Chromatography)

El principio común a todas ellas es el siguiente: un fluido (fase móvil) circula a través de la fase estacionaria y cuando una mezcla de sustancias se introduce en el sistema se produce una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud para cada componente de la mezcla, por lo que cada uno de ellos se desplazará con diferente velocidad (dependiendo de sus solubilidades, valores de pKa, capacidad de formar puentes de hidrógeno, etc.) a lo largo del sistema.

La cromatografía en fase líquida puede llevarse a cabo en columna, donde la mezcla a separar se desplaza en una dirección preferencial sobre las otras dos o bien, puede tratarse de una técnica planar, cuando dicho movimiento se realiza sobre un plano donde prevalecen dos direcciones sobre la tercera. De este modo la Cromatografía Líquida de Alta Presión, HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) es un procedimiento en columna, mientras que las técnicas de capa fina, CCD o TLC (Thin Layer Chromatography) o capa fina de alta resolución, HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) son procedimientos planares.

4.1- Cromatografía en Capa Delgada (CCD o TLC).

La CCD es una de las técnicas más ampliamente usadas para la separación e identificación de drogas. Permite en ciertos casos también, determinar semicuantitativamente los compuestos de una muestra. Se trata de un procedimiento no destructivo de los componentes a investigar, accesible a la mayoría de los laboratorios por su simplicidad y bajo costo.

Las muestras a investigar pueden consistir en soluciones, sólidos disueltos o extractos obtenidos en los procedimientos de aislamiento ya descriptos. La técnica de CCD involucra diferentes pasos, denominados: preparación de la placa, aplicación de la muestra, corrida de la placa y ubicación de las manchas.

Aunque pueden prepararse en el laboratorio, en la actualidad se usan placas comerciales. Las FE están constituidas por partículas irregulares con poros en su interior. Estos rellenos se extienden uniformemente en una capa delgada de 250 um (las más usadas), 200 um, 150 um o 100 um sobre un soporte de vidrio de 2 mm, sobre un folio de aluminio de 0.2 mm o sobre un folio de poliéster de 0.5 mm de espesor. Las placas suelen tener un tamaño de 20 cm x 20 cm pudiendo cortarse del tamaño elegido (particularmente los folios con una tijera).

Existen varios tipos de FE que se diferencian en su porosidad, espesor, granulometría. Se describen a continuación las más utilizadas.

SILICA GEL: se trata de ácido silícico hidratado y por lo tanto débilmente ácido. Las placas tienen una distribución uniforme de tamaño de partícula, normalmente de 20 um de diámetro. La adherencia a la placa se logra mezclando un agente de unión con la FE. Cuando se usa sulfato de calcio (gypsum) como ‘”unidor”, las placas se denominan sílica gel G. Las placas más fuertes usan un unidor orgánico. Las placas pueden almacenarse una sobre otra ya que la capa adsorbente es muy dura.

ALUMINA: (óxido de aluminio). Es un adsorbente débilmente básico. Tiene menos aplicaciones que la sílica y necesita ser activado para obtener buenas separaciones.

KIESELGUHR: se trata de ácido silícico amorfo existente en la Naturaleza. Proviene de los esqueletos de diatomeas (algas microscópicas) y por ello se denomina frecuentemente “tierra de diatomeas”. Posee menos propiedades adsortivas que la sílica.

FLORISIL: se trata de silicato de magnesio, se usa únicamente para separaciones de pesticidas o eliminar compuestos altamente polares cuando otros adsorbentes han fallado.

CELULOSA: usa procesos de partición para la separación. Las placas de celulosa generalmente corren mucho más lentamente que las placas de sílica del mismo espesor.

Para procedimientos de adsorción, las capas deben tener la mayor actividad posible en los poros. Para ello se someten placas y folios en el momento de su fabricación, a la acción de unos 110 ºC en estufas secadoras continuas, desalojando de este modo humedad, gases y contaminantes orgánicos.

Para procedimientos de partición en cambio, las capas se inactivan química o físicamente en sus poros, impregnándolas con diferentes reactivos hidrofobizantes. Los componentes se separarán de acuerdo a su solubilidad en los hidrofobizantes anclados.

Los sistemas de CCD de partición de **FASES REVERSAS**están constituidos por placas cubiertas con partículas de sílica a cuyos grupos hidroxilos se les han unido cadenas hidrocarbonadas de varias longitudes y utilizan fases móviles conteniendo agua. Poseen un alto poder de resolución y son comercialmente reproducibles. La fase más popular es aquella unida

con cadenas de C18 (octadecil) de 12% p/p sobre la sílica. Las fases móviles generalmente empleadas son las mezclas de metanol: agua o acetonitrilo: agua y las propiedades de estas CCD se correlacionan bien con los sistemas HPLC usando similares FE.

La muestra se aplica dibujando con un lápiz una línea a 1,5 cm del borde inferior de la placa. Sobre esta línea de origen se aplicarán los extractos separados 1 cm uno de otro. La muestra, (usualmente 1 – 10 ug) es aplicada en un pequeño volumen de solvente (1 a 10 ul) con micropipeta o a través de un tubo capilar o una microjeringa. Lo importante es que la mancha no supere los 4 mm de diámetro, sino se perderá resolución. La superficie de la placa no debe ser cortada o agujereada por el aplicador.

El solvente usado para aplicar la mancha debe ser volátil y tener baja polaridad de modo que la mancha no difunda mucho. El solvente puede aplicarse en alícuotas y secar naturalmente o por aplicación de aire caliente. Es importante que la mancha esté seca al final de la siembra, especialmente si la solución contenía agua.

La mayoría de los compuestos orgánicos son incoloros, razón por la cual deben hacerse visibles, preferiblemente con una técnica no destructiva. Es por ello que algunas placas poseen en su composición de FE un indicador fluorescente. Se trata de metasilicatos de Al, Zn, Co, de gran polaridad, distribuidos en los poros de todo el absorbente y que no serán eluidos.

La siembra se controla examinando la placa bajo luz de onda corta (254 nm), el indicador se excita y fluoresce a 561 nm observándose un fondo verde azulado en la placa. Los analitos presentes en la placa tapan al indicador al cual no le llegará luz, por ende no fluoresce y los compuestos pueden localizarse como manchas oscuras sobre el fondo verde.

Si se ilumina la placa con luz UV de mayor longitud de onda (366 nm), las drogas con fluorescencia natural pueden ser vistas, independientemente de la presencia de un indicador. Es el caso, por ejemplo, de las aflatoxinas.

ELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL Y CORRIDA DE LA PLACA.

La fase móvil esta constituida generalmente, por uno o varios solventes orgánicos. Cuando las drogas son aniones o cationes fuertes corren mejor si se añade a la FM pequeñas cantidades de ácidos o álcalis para formar pares iónicos. Como regla, se utilizan solventes fáciles de obtener en forma pura y de bajo costo, estables al aire o cuando se mezclan con

ácidos y bases. Dichos solventes no deben reaccionar con las sustancias a separar y deben ser fácilmente removidos de la placa después de la corrida cromatográfica.

Una vez que la FE ha sido elegida, es fundamental tener en cuenta la polaridad de la FM, porque de ella depende el mayor o menor desplazamiento de un componente de interés, para separarlo de los demás analitos de una mezcla. Un buen indicador de la polaridad es la constante dieléctrica de los solventes empleados. Los disolventes menos polares tienen constante dieléctrica del orden de 2 (hidrocarburos saturados de cadena abierta: n-hexano, n-heptano). Las constantes dieléctricas de los disolventes orgánicos más polares tienen valores entre 30 y 40 (metanol, acetonitrilo). El agua tiene una constante dieléctrica de 81 y el agregado de ácidos, álcalis o sales al agua puede incrementarla por encima de 100.

La corrida cromatográfica se lleva a cabo en una cámara de desarrollo saturada. Esta cámara consiste en un tanque de vidrio sellado, al cual se añade la FM y se espera 30 minutos para lograr el equilibrio con su vapor. Luego se coloca la placa en posición vertical de modo que la línea de aplicación quede por encima del nivel de la FM (100 ml para placas de 20 cm x 20 cm).

Las placas de 20 cm se corren generalmente una distancia de 10 a 15 cm, aunque esto puede involucrar tener que esperar hasta 2 hs. Dado que el tiempo de desarrollo aumenta exponencialmente con la distancia recorrida, el mismo puede reducirse si las placas son corridas sólo 5 cm, con ello se incrementa también la sensibilidad ya que las manchas no difunden tanto, pero disminuye la resolución.

Otro tipo de cámara es la unidad sandwich en la cual la placa de TLC se coloca horizontalmente y el solvente de desarrollo en uno de los extremos. La ventaja de este sistema es que usa menos fase móvil, provee una rápida saturación del sistema y requiere cortos tiempos de corrida.

Terminada la corrida, la placa es removida del tanque y la posición del frente de solvente es rápidamente marcada con un lápiz antes de que se evapore. El solvente puede ser luego evaporado naturalmente o bajo corriente de aire caliente.

UBICACIÓN DE LAS MANCHAS.

Las manchas distribuidas a lo largo de la placa se visualizan mediante luz UV (254 nm y 366 nm), como se mencionó anteriormente y se marcan con un lápiz. Algunas drogas no

absorberán a la luz UV debido a que no están en la forma iónica correcta sobre la placa o por su estructura. Por ejemplo, los barbitúricos no se ven si la placa es ácida, pero se ven cuando se rocía la placa con vapores de amoníaco. Similarmente algunas base pueden verse mas fácilmente cuando se usan vapores de ácido clorhídrico para cambiar el pH de la placa.

Luego puede aplicarse una serie de reactivos para poner de manifiesto las sustancias separadas en la placa, mediante la observación a simple vista de manchas coloreadas. Estos reactivos pueden ser de acción muy general, para la visualización de cualquier droga presente, o muy específicos para una clase de drogas (por ejemplo reactivo FPN para fenotiazinas). Entre ambos extremos están aquellos que reaccionan con ciertos grupos funcionales y otros que reaccionan con grupos generales de compuestos (ejemplo, Dragendorff para alcaloides). Además hay reactivos como Marquis o Mandelin que dan un rango amplio de colores y pueden ser muy útiles en procedimientos de identificación.

En varios casos, los reactivos pueden rociarse uno a continuación del otro, siempre que las drogas no sean destruidas o el pH de la placa no se altere demasiado por el spray anterior. Este procedimiento se conoce como revelado secuencial.

Los reactivos deben aplicarse a la placa como un fino aerosol usando una bomba manual o una línea de aire comprimido. El rociador debe moverse hacia arriba y hacia abajo y cubrir rápidamente toda la placa pero sin excederse. Es de gran ayuda anotar el cromatograma obtenido en un papel, a medida que se avanza en el revelado, indicando la posición y el color de las manchas.

Valores de Rf

La medida cromatográfica básica de una sustancia en TLC es el valor Rf, definido como:

$$Rf = \frac{\text{la distancia recorrida por la sustancia desde el punto de aplicación}}{\text{la distancia recorrida por el solvente desde el punto de aplicación}}$$

Este valor varía entre 0 y 1, siendo los más útiles entre 0,2 – 0,7. Es más práctico multiplicar Rfx100 para evitar el uso de decimales. La distancia recorrida por la sustancia se mide desde el centro de la mancha; en el caso de muestras “con cola” se mide el centro del área más intensa.

Los valores de Rf son afectados por varios factores. La calidad de la fase estacionaria y la uniformidad del espesor deben mantenerse para que no ocurran variaciones de lote a lote. El solvente usado para aplicar las muestras debe ser removido completamente antes de correr la

placa. Además la fase móvil debe preparase con solventes puros y en forma diaria para cada corrida si hay algún solvente volátil o higroscópico como la acetona y mantener las condiciones de saturación de la placa durante toda la corrida.

Aunque no es necesario un control preciso de la temperatura, debe evitarse colocar la cuba cerca de fuentes de calor, de la acción directa de luz solar, o corriente de aire. El aumento de temperatura evaporara los solventes volátiles mas rápidamente, los solventes correrán más rápidos y los valores de Rf decrecen ligeramente. Los valores de Rf pueden también variar cuando se aplican grandes masas de muestra o cuando se cambia la distancia de desarrollo.

Para tener en cuenta todos lo factores que pueden afectar los valores de Rf durante una corrida, es necesario correr en la misma placa compuestos de referencia cuyos valores de Rf sean exactamente conocidos y luego corregir el valor de la sustancia de interés. Para concluir que una determinada mancha coincide con alguno de los testigos empleados en el ensayo, debe coincidir tanto en el valor de Rf como en los cambios de color en cada paso del revelado. Esto debe cumplirse en todos los sistemas de FE/FM elegidos para su identificación.

CUANTIFICACIÓN.

Los avances en densitómetros y procesamientos de datos han permitido que la CCD sea una técnica cuantitativa con gran exactitud (CV: 2-5%). Los densitómetros trabajan en transmitancia, quenching de fluorescencia o reflectancia para medir absorbancia y a veces fluorescencia. Las placas pueden leerse con alto grado de resolución y las manchas pueden ser escaneadas varias veces para mejorar la relación señal/ ruido.

El principal inconveniente es aún la siembra de la muestra. Pero esto se soluciona con el uso de micropipetas calibradas, o microjeringas y el uso de estándares internos.

4.2 Cromatografía en Capa Fina Bidimensional.

Si fuera necesario separar varios componentes de una mezcla de polaridad muy distinta resulta difícil elegir una fase móvil adecuada, que permita una buena resolución de todos los componentes. Por ejemplo dados los compuestos A, B, C y D, tras la corrida con una FM de baja polaridad puede suceder que A y B queden muy próximos entre si y del punto de siembra. Mientras que C y D se separan bien.

Si se eligiera como FM un solvente más polar se logrará la separación de A y B pero probablemente C y D corran próximos a l frente de solvente. Una solución sería cambiar la fase estacionaria (emplear celulosa, por ejemplo). O bien, se puede recurrir a una cromatografía bidimensional. En este caso la placa es corrida en una FM de baja polaridad, de modo que se separen C y D. Luego se seca la placa y se cambia el solvente (mayor polaridad) pero también la dirección de corrida (giro de 90º).

Ventaja: se amplia el campo de polaridades.

Desventajas: sólo se siembra una muestra por placa y se requiere el doble de tiempo porque son 2 corridas. (la segunda mas lenta que la primera por la mayor polaridad del solvente que será retenido en los poros).

En la práctica, se suele llevar a cabo este tipo de CCD para la separación de Aflatoxinas, aprovechando el sencillo revelado mediante luz UV después de cada corrida.

4.3 Cromatografía en Capa Delgada de Alta Perfomance (HPTLC).

En comparación con las placas de sílica gel de CCD, las placas de HPTLC tienen partículas mucho más pequeñas y distribuidas en un estrecho rango de tamaño (2-7 μm). Además el espesor de la capa es más delgado (190 um). Estas características hacen que las corridas en HPTLC sean más rápidas y más reproducibles. Además permiten obtener una mayor resolución y una disminución del límite de detección. Son especialmente útiles para los trabajos de cuantificación.

Comparación entre TLC y HPTLC:

Condiciones típicas	**TLC**	**HPTLC**
Dimensiones de la placa (cm)	20x20	10x10
Tamaño de partícula (μm)	5 - 20	2 – 7
Espesor de la capa (μm)	100-250	150-200
Volumen de muestra (μl)	1-10	< 0.1
Diámetro de la mancha		
antes de correr(mm)	<4	<1.5
después de correr(mm)	5-10	2-5
Distancia de corrida(cm)	10-15	3-6
Tiempo de corrida (min)	30-120	5-15

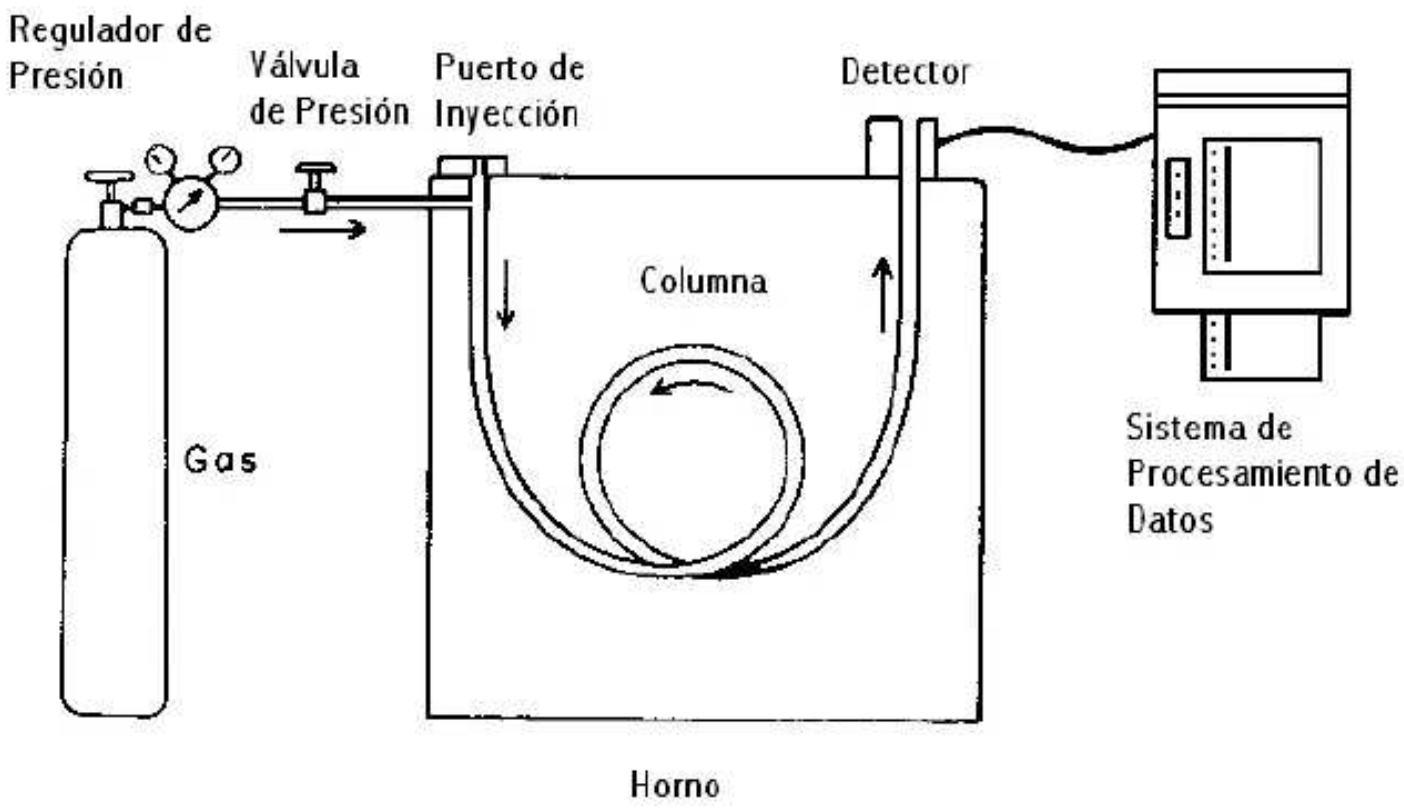
Número de muestras por placa	10-15	30-40
Límite de detección (absorción) ng	10-100	0.5-5
Límite de detección (fluorescencia) ng	0.1-1	0.01-0.1

Los límites de detección son para sustancias fuertemente absorbentes o fluorescentes

5- Cromatografía Gaseosa (CG).

La cromatografía gaseosa permite no sólo separar, sino también identificar y cuantificar cada uno de los componentes de una muestra, debido al riguroso control a que se somete cada una de las variables que intervienen en el proceso.

En este sistema la fase móvil es un gas (gas carrier o portador) pudiendo ser su fase estacionaria un sólido o un líquido adsorbidos sobre un soporte inerte que no sean volátiles a la temperatura de trabajo. Presenta como requisitos que las sustancias a analizar (gases, líquidos o sólidos) sean volátiles a la temperatura de trabajo (o puedan prepararse sus derivados volátiles mediante el uso de reactivos “derivatizantes” adecuados), que no se descompongan a altas temperaturas y posean bajo peso molecular. En el cromatógrafo la muestra se vaporiza en un inyector que está a elevada temperatura, donde una corriente de gas portador inerte y de alta pureza lo arrastra por la columna. Allí tiene lugar el proceso de separación bajo condiciones controladas de temperatura para luego pasar por un detector, cuya señal es registrada en un cromatograma.



Esquema básico de un cromatógrafo gaseoso.

Como se observa en el esquema anterior los cromatógrafos gaseosos contienen esencialmente:

1)- Una fuente de gas comprimido: proporciona la fase móvil (gas portador o gas carrier) cuya finalidad es arrastrar los componentes volátiles de la muestra. Los gases más usados son: hidrógeno, helio, nitrógeno y argón.

2)- Un regulador de presión o flujo del gas portador, cuya función es mantener constante el flujo del mismo durante todo el proceso para obtener resultados reproducibles.

3)- Un Inyector: es un dispositivo que permite la introducción de la muestra en la corriente del gas portador y transformarla rápida y uniformemente al estado gaseoso. Existe cierta variedad de diseño según el tipo de muestra que se trata de analizar. El más común es el inyector de líquidos, que puede utilizarse para sólidos (en disolución) y gases (mediante jeringas especiales). Se trata de una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente de ésta (a temperatura superior al punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra, generalmente); suele tener una membrana de caucho a través de la cual se introduce la muestra, con la ayuda de una microjeringa hipodérmica.

4)- Una Columna Cromatográfica: es un tubo de vidrio o metal (acero inoxidable, cobre, aluminio, etc.) cuya longitud oscila entre 1 y 200 m, su diámetro interior puede ser desde 0,1 a 50 mm, según el tipo de columna. La separación de la mezcla se realiza en ella, siendo por tanto, la parte más importante del equipo.

Actualmente se pueden utilizar tres tipos de columnas: empacadas, intermedias y capilares. En términos generales las columnas empacadas tienen 2-4 m por1/4 a 1/8 pulgada de diámetro interno. Pueden ser de vidrio o metálicas. Las columnas capilares tienen un diámetro interno menor de 1 mm y una longitud de 2 a 100 metros. Pueden ser de acero inoxidable, vidrio borosilicato o de sílice fundida y contienen la fase estacionaria sobre la pared de la columna quedando la parte central vacía. Con las columnas capilares se pueden obtener resoluciones semejantes a las columnas empacadas pero en menor tiempo, o de lo contrario se puede obtener una mayor resolución en el mismo tiempo.

Las fases estacionarias empleadas con mayor frecuencia, debido a su universalidad, son las relativamente no polares de silicona, como metilsilicona o 2-5% fenilmetilsilicona. También se ha propuesto el uso de algunas fase moderadamente polares como 14% cianopropil metilsilicona.

5)- El horno, en cuyo interior se sitúa la columna, debe poseer una buena regulación de temperatura. Para mejorar la separación el calentamiento del horno se realiza de forma programada, pudiendo consistir en una única rampa de temperatura o en dos y hasta cuatro rampas.

6)- El detector. Es un dispositivo que permite medir de una manera continua una propiedad física del gas portador, que se modifica ampliamente con la presencia de muy pequeñas concentraciones de la sustancia a analizar (conductividad térmica, corriente de ionización, afinidad electrónica, etc.). Genera una señal eléctrica proporcional al contenido de cada componente de la muestra.

Los más usados en Toxicología son el detector de ionización de llama (FID), el detector de captura electrónica (ECD) y el detector de nitrógeno-fósforo (NPD). El NPD es específico y sensible para los compuestos que contienen átomos de N o P en su molécula, como las drogas de abuso y medicamentos, ya que la mayoría contiene átomos de N, así como en el análisis de plaguicidas organofosforados y carbamatos que contengan átomos de N y/o P. El ECD, es de gran utilidad para el análisis de compuestos electronegativos con átomos de halógenos o grupos nitro o carboxilo, como es el caso de los pesticidas organoclorados y piretroides, y el FID es sensible a compuestos orgánicos que contengan uniones C-H en sus molécula, una de sus características es que pueden analizarse muestras acuosas, ya que no detecta al agua.

7)- Sistema electrónico de amplificación y medida de la señal eléctrica enviada por el detector y registrador de la misma.

Un **cromatograma** está compuesto por una serie de picos. Cada pico determina la presencia de por lo menos una sustancia, y el área inscripta por debajo del mismo es proporcional a la cantidad de dicha sustancia en la muestra inyectada.

Para identificar una sustancia se usa un parámetro llamado tiempo de retención (tr) que es constante para cada sustancia en determinadas condiciones, y se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y el momento en que se detecta su mayor concentración (ápice del pico). También puede usarse el tiempo de retención relativo, que es el tiempo que tarda en eluir una sustancia de la columna, con respecto al tiempo que tarda una sustancia x en el mismo sistema. Este valor permite corregir posibles variaciones del tr durante el desarrollo del programa cromatográfico. Existen parámetros más exactos aún como los índices de Kovatz, que permiten estandarizar el comportamiento de las sustancias en un determinado sistema cromatográfico.

Antes de la aplicación de la GC y de la GC/MS, se recurre frecuentemente a la **derivatización** de los grupos funcionales polares (átomos de H más activos). El objeto de esta reacción es aumentar la volatilidad, aumentar la estabilidad térmica o disminuir el limite de detección debido a la mejora en la simetría del pico, eliminando, además de eliminar las llamadas colas en los cromatogramas. Se mejora considerablemente la separación de sustancias conteniendo grupos funcionales tales como –COOH, -NH, $-NH_2$–OH.

Para que la derivatización sea exitosa, debe ser cuantitativa y formarse un solo derivado en forma rápida y reproducible. Los procedimientos más utilizados son la acilación, la metilación y la silanización.

6- Cromatografía Líquida de Alta Perfomance (HPLC).

Como se mencionó anteriormente, en este sistema cromatográfico la fase móvil es un líquido. Se puede utilizar para la separación de cualquier compuesto orgánico ya que la técnica por HPLC no está limitada por la volatilidad ni la estabilidad térmica del analito. Se aplica, por ejemplo, para la separación, identificación y/o cuantificación de productos farmacéuticos, extractos vegetales, proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, polisacáridos, pigmentos, metabolitos animales o humanos, etc.

Las siglas iniciales de HPLC se debieron a “High Pressure Liquid Chromatography” pero dado que la presión sólo constituye una herramienta que fuerza a la fase móvil a atravesar la columna, sin constituirse en sí misma una variable del sistema, se buscó darle otro significado a las ya tan conocidas siglas, resultando en “High Performance Liquid Chromatography”.

Los principales componentes de un cromatografo liquido son la fase móvil contenida en un reservorio, el cual llega a la bomba que suministra un flujo continuo y constante y alcanza la columna, pasando previamente por la válvula de inyección. La FM atraviesa la columna y finalmente llega al detector, luego de lo cual pasa por una válvula que permite su colectado o bien su descarga.

1)- Reservorio de solventes: es el recipiente que contiene la fase móvil (cualquier frasco de vidrio o polímero resistente, de buena calidad, con tapa). En general se ubica por encima del nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo las conexiones llenas. La FM debe ser de calidad cromatográfica, es decir, libre de sustancias orgánicas y de partículas mayores de 0,5 um. En el extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero (buzo) que impide el ingreso de partículas a la bomba.

2)- Tuberías: la FM empleada en HPLC debe circular por tuberías que conectan los componentes del equipo. Obviamente estas tuberías deben ser inertes, empleándose tubos de acero inoxidables para conectar los componentes sometidos a alta presión (entre bomba-inyector, inyector–columna, columna-detector y detectores entre sí). Además se usan tuberías poliméricas (polipropileno o teflón) para conectar los componentes donde la presión es atmosférica o ligeramente superior (reservorio-bomba, detector-frasco de desperdicios).

3)- Bomba: impulsa la fase móvil desde el reservorio de solvente al inyector y de allí a la columna. Las más usadas son las bombas de pistón.

Para cubrir el amplio rango de compuestos a separar se han propuesto eluciones en gradiente, es decir, se varía la composición de la FM (porcentajes de los solventes) comenzando la elución con un solvente débil y aumentando progresivamente la proporción del solvente “fuerte”. Para formar estos gradientes se emplea generalmente una bomba y válvulas solenoides que entregan cada solvente en una cámara de mezclado de pequeño volumen; la fase móvil formada en cada instante es entregada a la bomba.

4) Inyector: es una válvula que permite la introducción de la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. Las proteínas presentes en la matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra para evitar que precipiten dentro del equipo. Además la muestras y estándares a inyectar deben estar totalmente libres de partículas en suspensión, ya que pueden rayar los sellos del inyector o bloquear tuberías. Para ello se utilizan filtros desmontables o fijos de 0,45 o 0,22 μm.

5)- Columna Cromatográfica: en general es de acero inoxidables, de 25 a 30 cm de longitud y 2 - 4 mm de diámetro interno, aunque en la actualidad existe variedad en el tamaño y material (columnas de acero recubierto con vidrio, plásticas, etc.).

Las FE utilizadas en HPLC tienen un tamaño de partículas muy pequeño (5- 10 um) para favorecer la interacción entre las moléculas de muestra y la FM y aumentar de este modo la

eficiencia en la separación de los componentes. Además la cantidad de FE es baja, lo que disminuye el tamaño de las columnas y los tiempos de corrida.

El mecanismo más común, es la cromatografía en fase ligada. Las FE involucradas se denominan fases químicamente unidas (BPC), tienen sílica como soporte, y diferentes grupos químicos unidos a sus grupos silanoles. Son muy variables en cuanto a polaridad y selectividad de acuerdo al "líquido" unido a la silica: C_{18}(octadecilsilano), C_8(octisilano), C_2(dimetilsilano), CN (nitrilo), NH^2(aminopropil), diol.

Las más usadas en Toxicolgia son las de C_{18} y C_8, de baja polaridad que utilizan como fase móvil mezclas de agua (o soluciones salinas, buffers) con solventes orgánicos polares (por ejemplo, acetonitrilo, metanol)

Existen otros tipos de FE, como las basadas en la adsorción, en el intercambio iónico, y en la exclusión molecular.

6) Detectores: los *detectores generales* miden el cambio de alguna propiedad física de la FM que contiene al analito en comparación con la FM pura, por ejemplo, el detector de índice de refracción. Los *detectores selectivos* son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo, el detector UV que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una dada longitud de onda; el detector de fluorescencia empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico (ya que HPLC también puede recurrirse a la derivatización) y el detector electroquímico, empleado en la detección de analitos capaces de oxidarse o reducirse ante la aplicación de un potencial.

7)- Sistema electrónico de amplificación y medida de la señal eléctrica enviada por el detector y registrador de la misma.

A continuación se muestra un cuadro comparativo entre GC y HPLC.

	CG	**HPLC**
Compuestos a analizar	Gases, líquidos o sólidos volátiles o capaces de ser volatilizados, de bajo peso molecular.	Líquidos o sólidos no volatiles Compuestos termolábiles, o de alto peso molecular.
Influencia de la fase móvil	La FM es un simple carrier del soluto y prácticamente no influye en la separación. El gas a usar depende del detector.	La FM es el parámetro fundamental que gobierna la separación. La FM no es inerte.
Columnas	Se requieren muchos tipos de	Una sola columna es capaz de separar

	columnas para abarcar todas las separaciones posibles	sustancias polares, iónicas, no polares simplemente modificando la FM
Detectores	Diferencian fácilmente el soluto de la FM (gas inerte). Por ejemplo: captura electrónica, ionización en llama, etc.	Deben diferenciar el soluto en solución, de la fase móvil (liquida en alta proporción). Por ejemplo: fluorescencia UV, electroquímico, etc.

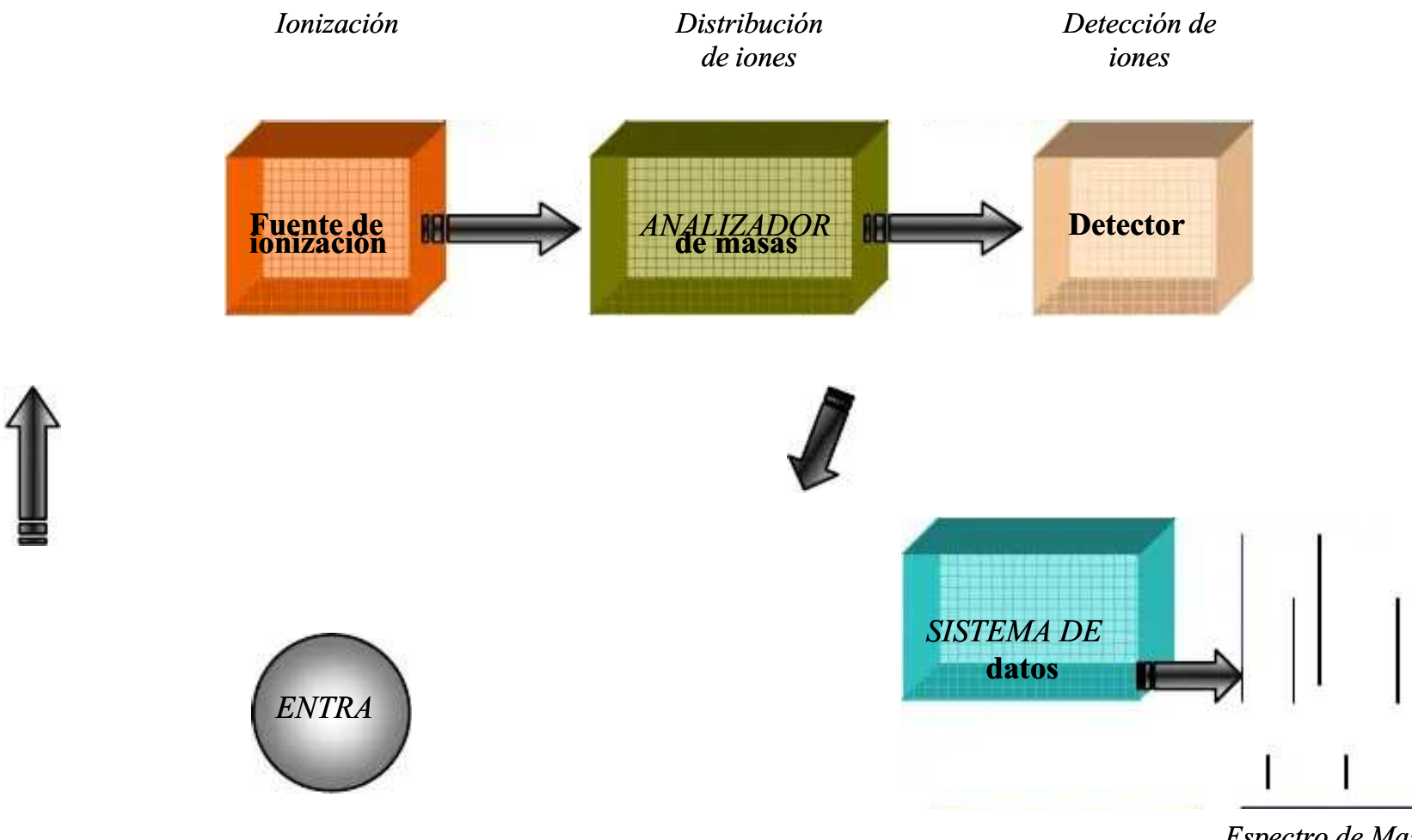
Al igual que en GC, la identificación de una sustancia por HPLC se basa en el tiempo de retención obtenido, comparado con testigos, con las consecuentes dificultades en cuanto a su reproducibilidad. Además, a pesar de cuidadosas purificaciones, ciertas interferencias pueden inducir resultados falsos positivos o impedir una adecuada identificación y cuantificación. Por otro lado, puede ocurrir que algunas sustancias eluyan juntas o muy próximas. Es decir en varias oportunidades, el tiempo de retención no es suficiente para proporcionar una información definitiva, por lo que conviene recurrir a un método de confirmación como la espectrometría de masas (MS). La separación se realiza con el CG (o el HPLC) de acuerdo a sus tiempos relativos y la determinación se hace por la fragmentación de los iones característicos del analito: GC-MS y HPLC-MS.

7- Espectrometría de Masas.

La espectrometría de masas es una poderosa técnica analítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar materiales conocidos y elucidar las propiedades químicas y estructurales de las moléculas.

La muestra, puede ser un sólido, líquido o vapor pero el espectrómetro de masas, requiere que la muestra sea transformada en un gas. Por ello en el primer paso la muestra es introducida dentro de la cámara de vacío y luego ionizada en la fuente de iones. Los iones, los cuales están en fase gaseosa, son distribuidos en el analizador de masas de acuerdo a su relación masa / carga (m/z) y luego colectados por el detector.

En el detector, los iones generan una señal eléctrica proporcional a su número. El sistema de datos registra estas señales eléctricas y luego las convierte en el espectro de masas. Un espectro de masa es un grafico de la abundancia de iones versus la relación masa-carga. Los iones y sus abundancias sirven para establecer el peso molecular y la estructura de los compuestos que están siendo analizados.



Esquema de los componentes de un espectrómetro de masas.

Un simple compuesto puede generar varios fragmentos. Dos compuestos ionizados simultáneamente crean un espectro solapado o superpuesto. Entonces para obtener el espectro de masa de un compuesto, las mezclas de compuestos deben ser separados en sus componentes individuales previamente al análisis por espectrometría de masas. La Cromatografía gaseosa es ampliamente usada con este fin, de modo que los compuestos separados en fase vapor, entran al espectrómetro y son analizados secuencialmente. Mas recientemente Cromatógrafos líquidos, Cromatógrafos de fluidos supercríticos y equipos de electroforesis capilar han sido conectados a un MS.

Como se mencionó anteriormente, los procesos que ocurren en un espectrómetro de masas son: 1) ionización, 2) distribución de las masas y 3) detección.

1) IONIZACION.

Los dos métodos de ionización más usados son el impacto electrónico y la ionización química. El impacto electrónico es un proceso físico donde se transfiere energía mediante la colisión de electrones con las moléculas de la muestra en fase gaseosa. Debido a que la energía de los electrones de bombardeo es generalmente mucho más grande que la de las uniones moleculares cuando ocurre la interacción las uniones se rompen y se forman fragmentos iónicos. Los iones negativos formados y los electrones son atraídos por un cátodo cargado positivamente o una trampa de electrones. Las moléculas y fragmentos neutros que no son ionizados son bombeados lejos. Los iones positivos son impulsados dentro del analizador y enfocados hacia un sistema de lentes.

La energía empleada en la ionización electrónica puede conducir a una fragmentación excesiva, dejando poca o ninguna traza del ión molecular. En ausencia de un ión molecular, el peso y la estructura no son fáciles de determinar. Esto ha conducido al desarrollo de técnicas de ionización de baja energía, como la ionización química. En esta técnica, se producen iones por un proceso relativamente suave de transferencia de protones cuando la muestra se mezcla con un exceso de reactivo gaseoso ionizado como metano, isobutano, amoníaco, etc. Los iones originados tendrán una unidad de masa mayor.

Actualmente existen otras métodos de ionización, conocidas como técnicas de ionización-desorción, cuya gran ventaja es que pueden aplicarse a moléculas frágiles o no volátiles.

2) DISTRIBUCIÓN DE MASAS.

Los tres analizadores mas ampliamente utilizados son: sectores magnético y eléctrico, cuadrupolos y trampa de iones. Otros dos están siendo usados con mayor frecuencia en laboratorios de investigación: fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) y el tiempo de vuelo (TOF).

2) DETECCIÓN.

Los espectrómetros de masa pueden operar en dos modos diferentes, el registro total o "*full scan"* y el de iones seleccionados " *selected ion monitoring"* (SIM). En la modalidad de registro total, el espectrómetro barre todos los iones presentes dentro de un rango de valores masa/carga, que normalmente oscila entre 40 y 650. En la modalidad SIM, el instrumento se prepara para detectar únicamente un ión (*single ion monitoring*) o varios iones (*multiple ion monitoring*) de abundancia relativamente grande, o de relación masa / carga significativa en el

espectro de masas del compuesto de interés, resultando un cromatograma que responde sólo a compuestos en cuya fragmentación estén presentes los iones seleccionados.

La ionización mediante impacto electrónico usando la modalidad de full scan es la de mayor aplicación en el campo toxicológico, ya que el espectro de masa o patrón de fragmentación obtenido en estas condiciones, es como una huella dactilar, que contiene suficiente información para caracterizar la molécula, permitiendo confirmar su identidad, o en el caso que esta se desconozca buscarla en las librerías de espectros de referencia que estén disponibles.

7.1 Métodos en Tándem.

En algunos casos las concentraciones de los compuestos de interés son tan bajas, como ocurre con los compuestos cannábicos en el pelo o con algunos análisis de agentes de doping, que la GC-MS no posee sensibilidad suficiente para detectarlos, por lo que hay que recurrir al tándem MS-MS, de más reciente aparición. Mediante el acoplamiento de dos etapas de análisis de masa (MS/MS), se puede generar el espectro de masa de iones individuales.

A partir de mezclas de iones, un ión madre es seleccionado en la primera etapa del análisis de masas. El ión parental es luego fragmentado y los iones hijos resultantes son analizados según sus masas en una segundo etapa. Para instrumentos de cuadrupolo o sector cada etapa de análisis de masa requiere un analizador de masa separado. Para trampa de iones o ICR, el experimento MS/MS puede ser conducido secuencialmente en tiempo con un único analizador de masas.

Esta metodología se caracteriza por su gran selectividad y sensibilidad, del orden de los fentogramos.

8. Interpretación de los resultados.

La interpretación de los resultados es el punto que requiere mayor atención y cuidado a efectos de asignarle al resultado de un análisis toxicológico el exacto significado que encierra y transformarlo en un elemento de real utilidad para el caso en cuestión.

Primeramente, debe consignarse claramente las unidades y la forma de expresión de los resultados. En general los resultados siempre relacionan cantidad de una sustancia en un determinado volumen de líquido (sangre, orina, etc). Es importante remarcar que la cantidad de las sustancia investigadas es habitualmente escasa, menores al gramo, por lo tanto es necesario utilizar fracciones o submúltiplos de la unidad que se utiliza. La validez de un resultado esta respaldada por la sensibilidad y la especificidad del método analítico empleado.

9. Elaboración del informe.

Los resultados encontrados deben registrarse en una planilla indicando la fecha, el nombre del paciente y otros datos de información relevantes incluyendo el número y naturaleza de la muestra recibida para el análisis y el ensayo realizado. Asimismo, es importante considerar que un análisis en el cual no se detectan compuestos en plasma, suero u orina u otro tipo de muestra, debe indicarse el límite de detección del método.

El informe deberá consignarse la sensibilidad y especificidad que serán obtenidas de bibliografía, y la precisión y exactitud de los mismos, es decir, el desenvolvimiento particular de la metodología, cuando corresponda. Debe ponerse atención entonces en los rangos de seguridad de los datos entregados y las cifras significativas con que se informan. También se anotarán posibles interferencias que podrían haber modificado los resultados.

Antes de emitir el informe, todos los datos analíticos deben ser revisados por una persona con capacidad científica y con experiencia en los métodos analíticos empleados. La revisión debe incluir, al menos, documentación sobre la cadena de custodia, validez de los datos analíticos cualitativos y cuantitativos (cromatogramas de la muestra, de patrones y de un blanco) y datos del control de calidad. Por último se emitirá un informe escrito que presente los resultados del análisis y toda la información relevante de forma clara, exacta y sin ambigüedades.

Es necesario disponer de un archivo de registros, que documente las actividades y operaciones llevadas a cabo y que incluya una copia del informe, datos de la cadena de custodia, hojas de trabajo, datos de laboratorio y registros de los análisis de garantía de calidad y de los controles de calidad. Ello debe ser lo más claro posible de manera que permita seguir todos los pasos del análisis y elaborar conclusiones en caso de desviaciones. Se deben guardar durante un tiempo, que depende de las normativas gubernamentales, pero que, en general, es como mínimo de cinco años y tienen, por tanto, un valor potencial a largo plazo, sobre todo en

los análisis toxicológicos que puedan estar envueltos en litigios, especialmente cuando los juicios se celebran años después de haber emitido el informe.

Tradicionalmente se han usado diferentes tipos de microensayos químicos que de forma presuntiva y rápida dieran información cualitativa sobre la presencia de tóxicos individuales, o de grupos y familias de medicamentos y drogas. Los resultados de estos ensayos y procedimientos, conocidos usualmente como "métodos de screening", debían ser confirmados por otras técnicas o procedimientos de mayor capacidad identificativa y que posteriormente, permitieran la correspondiente cuantificación. La evolución de estas técnicas ha llegado al actual auge de los inmunoensayos, que fundamentalmente están desarrollados para muestras líquidas con bajas interferencias de la matriz, tales como orina, aguas, sueros, etc.

Bibliografía.

Buonomo et al. Introducción a la Cromatografía Gaseosa. Asociación Química Argentina. División Cromatografía. 2000.

Bañuls M.V. et al. Cromatografía de Gases I. Ed. Alhambra.1970.

Clarke's Isolation and identification of drugs (in pharmaceuticals, body fluids and post morten material). 2nd Ed. The Pharmaceutical Society of Great Britain. London, 1986.

Flanagan, R.J. et al., Basic Analytical Toxicology. Ed.(WHO). Geneva,1995.

Clarke's analysis of drugs and poisons. Moffat, A; Widdop, B; Osselton, D. (Eds), Pharmaceutical Press, (2004).

Frejaville, J.P. et al. Toxicología Clínica y Analítica. 1ra ed. Ed. JIMS. Barcelona 1979.

Guía de Trabajos Prácticos de Toxicología y Química Legal. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. 2002

Guía de Trabajos Prácticos de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. 2000.

Keve, N. Curso de Cromatografía Líquida Planar. Asociación Química Argentina. 1999.

Quattrocchi, O.A., Abelaira, S. Y Laba, R., Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Buenos Aires 1992.

Stahr, H.M., Analytical Methods in Toxicology. Ed. John Wiley and Sons, Inc. 1991.

The Supelco Guide to Solis Phase Extraction. Supelco, Inc. 1988.

Basic Gas Chromatography serie Techniques in Analytical Chemistry, Ed. Wiley and Sons, 1998.

Introduction to Modern Liquid Chromatography, Snyder y Kirkland, Ed. Wiley and Sons, 1979.

Static Head Space – Theory and Practice, Kolb and Ettre, Ed. Wiley, 1997.

Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. Robert E. Ardrey John Wiley & Sons, 2003.

Capítulo 4

Tóxicos Volátiles y Gaseosos.

Autores:

Dra. Leda Giannuzzi.

Profesora Adjunta de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la UNLP.

Dra. Mabel Tomas.

Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la UNLP.

Dr. Luis A. Ferrari.

Perito Químico Judicial. Profesor de Toxicología en la Universidad de Morón

4. Introducción.

Se clasifican como tóxicos volátiles y gaseosos a todas las sustancias que

independientemente de su estado físico, puedan separarse de la matriz que los contienen por destilación simple, destilación por arrastre con vapor, microdifusión y cromatografía gaseosa empleando head-space.

En forma general podríamos decir que las vías de entrada de estos tóxicos al organismo es la digestiva y la pulmonar, siendo también importante la vía cutánea para las sustancias más lipofílicas. Entre los tóxicos gaseosos más relevantes encontramos: monóxido de carbono, ácido cianhídrico, ácido sulfhídrico, arsina, estibidina, cloro, óxidos de nitrógeno, bromo, ozono, amoníaco, fosfina, entre otros.

Entre los tóxicos volátiles más importantes encontramos: ácido acético, cetonas, aldehídos, benceno, fenol, alcoholes primarios (etanol, metanol), glicoles, nitro y dinitrobenceno, éter, cloroformo, tetracloruro de carbono, fósforo, plaguicidas organoclorados, carbamatos, organofosforados, piridina, etc.

La mayoría de los compuestos provocan intoxicación aguda y muerte rápida, por ello, las investigaciones toxicológicas se realizan en sangre y en muestras obtenidas del tracto gastrointestinal o respiratorio donde se encuentran estos tóxicos en grandes cantidades. En el presente capítulo se presentan diversos protocolos de análisis de los tóxicos gaseosos y volátiles que con mayor frecuencia se presentan en un laboratorio de toxicología.

4.1 Tóxicos gaseosos.

Los tóxicos gaseosos son venenos presentes en el aire que generalmente se encuentran en estado gaseoso y alcanzan el cuerpo por inhalación. Un adulto inhala una masa de 15 kg de aire por día y simultáneamente expone una gran superficie de su cuerpo a xenobióticos. Los efectos tóxicos pueden desarrollarse muy rápidamente ya sea en forma sistémica (ácido clorhídrico, sulfuro de hidrógeno) o localmente en el tracto respiratorio (cloro o dióxido de azufre). Por otro lado, la exposición crónica a cloro, dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y ozono en pequeños niveles encontrados en el aire ambiental puede afectar la función pulmonar. Altas concentraciones de gases tóxicos como monóxido de carbono y cianhídrico se encuentran en situaciones de desastre químico debido a fuegos, explosiones pueden rápidamente causar la muerte a las personas que toman contacto con ellos.

La exposición a gases tóxicos ya sea en la industria o en aire urbano ha sido objeto de regulaciones. Así la American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH, 1996)

regula la exposición en el ambiente de trabajo. Ha establecido el llamado TLV-TWA (Threshold Limit Values-Time Weighted Average) para cada tóxico siendo la concentración media de sustancia química en el aire ambiental tras una exposición repetida de, 8 horas al día, durante 5 días de la semana, durante toda una vida profesional y que no producen efectos nocivos en la mayoría de los trabajadores. También se encuentra el valor de STEL (Short Time Exposición Level) referido a la concentración máxima a la cual un individuo puede estar expuesto durante un período continuo y hasta 15 minutos, sin sufrir efectos adversos, siempre y cuando no reproduzcan mas de cuatro de estas situaciones por día y estando separadas como mínimo en 60 minutos.

Otros valores de exposición desarrollados y periódicamente revisados son el RELs (Recommended Exposure Limits) publicados por National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH, 1994). También el Occupational Safety and Health Administration (OSHA, 1993) recomienda niveles de exposición dados por (PELs Permisible Exposure Limits como valore límite de exposición permitido. Estos límites y los valores alemanes MAK (Maximun Concentration in the Workplace son comparables a los valores TLV-TWA. Estas concentraciones son dadas en ppm, (ml/m^3) o (mg/m^3) a 20ºC y presión de 1013 hPa.

4.1.1 Investigación de monóxido de carbono en medios biológicos.

4.1.1.1 Características generales y mecanismo de acción.

El monóxido de carbono es un gas incoloro, inodoro, insípido y no irritante que se origina durante la combustión incompleta del carbón o derivados combustibles con carbono. Las fuentes productoras más frecuentes son braseros, estufas, calefones, hornos, incineradores, plásticos y automóviles en mal estado de funcionamiento.

La toxicidad del monóxido de carbono (CO) se debe a su combinación con la hemoglobina para formar carboxihemoglobina (COHb). En dicha forma la hemoglobina no libera oxígeno, dado que ambos gases (O_2 y CO) reaccionan con el grupo hemo en la molécula tetramérica de la hemoglobina. Sin embargo, la afinidad del monóxido de carbono por la hemoglobina es cerca de 240 veces mayor que por el oxígeno, de esta manera, la intoxicación

puede ocurrir aún cuando pequeñas cantidades de CO se encuentren presentes en la atmósfera.

En el caso de personas intoxicadas, cuando el paciente es removido del ambiente contaminado, la carboxihemoglobina desaparece rápidamente, particularmente cuando se administrada oxígeno al 100 %. Sólo trazas pueden ser detectadas cuando el paciente alcanza el hospital y de esta manera la determinación de carboxihemoglobina es raramente justificada en la clínica toxicológica. Sin embargo, no deja de ser útil la investigación de la metahemoglobina sobre todo cuando se ha inhalado sustancias oxidantes (óxidos del nitrógeno, por ejemplo).

$$CO + Hb.Fe.O2 \;<=======>\; Hb.Fe.CO + O_2$$

La formación de oxihemoglobina ($Hb.Fe.O_2$) como de carboxihemoglobina (Hb.Fe.CO) son reacciones reversibles y dependen principalmente de la presión parcial de los gases respirados y del pH sanguíneo aunque otros factores como la temperatura y la concentración iónica tienen también incidencia.

La toxicidad del CO se manifiesta no sólo en la interferencia en el aporte de oxígeno por la sangre sino también ejerce efecto directo al unirse a los citocromos celulares como los presentes en las enzinas respiratorias y la mioglobina.

4.1.1.2 Consideraciones generales en la analítica toxicológica.

En casos de sujetos muertos debido a intoxicación con CO, el aspecto del cadáver y el color carminado de las vísceras constituyen manifestaciones propias de la intoxicación aguda. Dicho color resulta visible en los órganos como el cerebro, corazón, pulmones y la musculatura voluntaria. En los casos en que el sujeto está vivo, la sangre deberá extraerse, a lo sumo hasta dos horas después de la exposición, puesto que gran parte del monóxido resulta eliminado por vía pulmonar. Para casos mortales, la muestra de sangre deberá extraerse lo más rápido posible antes que se inicien los procesos putrefactivos.

Se ha demostrado que el monóxido de carbono no se absorbe post-mortem constituyendo su determinación un índice del contenido en el momento de la muerte. La carboxihemoglobina es un derivado muy estable y su presencia en sangre puede demostrarse después de la descomposición cadavérica así como en cadáveres sometidos a altas

temperaturas. El color carminado típico de la carboxihemoglobina se observa en muestras de sangre cuando el porcentaje de saturación es del 30% o superior, distinguiéndose fácilmente de la oxihemoglobina o de la hemoglobina misma.

4.1.1.3 Toma de muestra.

La recolección de la muestra de sangre debe ser obtenida por punción venosa con anticoagulante (heparina) evitando la formación de burbujas o la entrada de aire a la jeringa. Se recomienda obtener sangre del corazón o de las venas gruesas como la femoral. El recipiente a utilizar para la conservación de la muestra debe estar escrupulosamente limpio, seco y cerrado en forma hermética.

4.1.1.4 Determinación analítica de carboxihemoglobina.

La determinación cuantitativa de la carboxihemoglogina en sangre puede realizarse por métodos espectroscópicos que se basan en los diferentes espectros de absorción que presentan la carboxihemoglobina respecto de la hemoglobina. En todos ellos se realizan medidas de absorción a distintas longitudes de onda de diluciones adecuadas de la sangre en estudio. Estas longitudes de onda corresponden a los máximos, mínimos o puntos isosbésticos de absorción de cada una de las especies de hemoglobina que coexisten en la muestra.

Otra propiedad que es utilizada por estos métodos es la gran estabilidad que presenta la carboxihemoglobina respecto de la oxihemoglobina frente a reactivos reductores o metahemoglobinizantes. A ojo desnudo, la sangre con alto contenido de carboxihemoglobina presenta un marcado tono carmín, mientras que la sangre con alto contenido de metahemoglobina es chocolate.

Se describen a continuación ensayos de tipo cualitativos que presentan carácter práctico para su identificación.

a) Ensayo de dilución:

El ensayo de dilución consiste en preparar soluciones sanguíneas al 1% en agua destilada de muestra a analizar y de sangre normal. Se observa simultáneamente ambos tubos de ensayo

con luz natural difusa. La sangre normal presenta color rojo amarillento, mientras la muestra, si contiene carboxihemoglobina, presenta color carminado neto. Este ensayo es seguro y práctico.

b) Ensayo alcalino:

Se basa en la mayor estabilidad de la carboxihemoglobina con respecto a la hemoglobina en similares condiciones alcalinas.

En un tubo de ensayo colocar 3 a 4 gotas de la sangre a analizar y en otro tubo similar colocar igual número de gotas de sangre normal, agregar 15 ml de agua destilada y mezclar bien. Agregar a cada tubo 5 gotas de solución de hidróxido de sodio al 10% y mezclar bien. La sangre normal adquiere color castaño a castaño verdoso (hematina alcalina), mientras que la sangre oxicarbonada permanece inalterada (color carminado durante cierto tiempo). El ensayo ofrece un neto contraste y resulta positivo cuando la concentración de carboxihemoglobina es superior al 10%.

La sangre fetal interfiere en este ensayo dado que última produce una transformación retardada frente al hidróxido de sodio. A continuación se describen diferentes métodos para la cuantificación de carboxihemoglobina en sangre: espectrofotométrico, químico e infra rojo.

4.1.1.5 Determinación cuantitativa de la carboxihemoglobina por el método espectrofotométrico.

Algunos métodos espectrofotométricos emplean el sistema oxihemoglobina-carboxihemoglobina. El siguiente método se basa en que la sangre normal contiene varias formas de hemoglobina (la forma reducida, la forma oxidada, y pequeña cantidades de metahemoglobina), y si un agente reductor como el ditionito de sodio es agregado a la sangre, la forma oxigenada y la metahemoglobina son cuantitativamente convertidas a la forma reducida que presenta un espectro como se presenta en la Fig.4.1. Debe recordarse que en caso de que la persona haya estado expuesta a sustancias metahemoglobinizantes esta determinación es poco recomendada.

El monóxido de carbono presenta mayor afinidad por la hemoglobina que el oxígeno mientras que la carboxihemoglobina no es reducida por el ditionito de sodio.

Así, la carboxihemoglobina permanece sin modificarse como se muestra en la curva A del espectro en la Fig.4.1 aún cuando se ha realizado un tratamiento con ditionito de sodio.

En la Fig. 4.1 se observa que la máxima diferencia de absorbancia para los espectros de carboxihemoglobina (A) y hemoglobina reducida (B) se presenta a 540 nm, mientras que 579 nm presenta la misma absorbancia (punto isosbéstico). El porcentaje de saturación de monóxido de carbono en una muestra de sangre puede calcularse de la medida de la absorbancia a esa longitud de onda de la muestra saturada con monóxido de carbono (A), la muestra libre de monóxido de carbono (B) y la muestra sin tratar (C) luego de la reducción con ditionito de sodio.

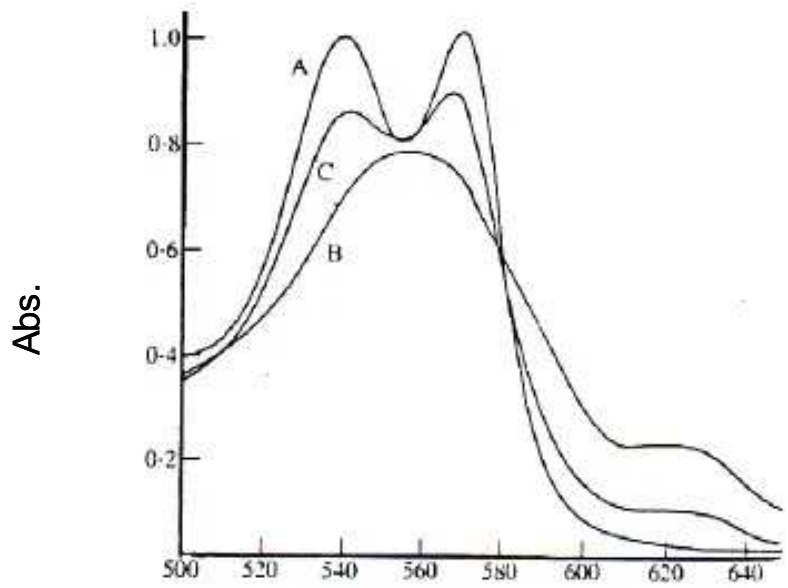


Fig. 4.1: Espectros de absorción de (A) carboxihemoglobina, (B) hemoglobina reducida y (C) muestra de sangre de paciente intoxicado con monóxido de carbono.

Reactivos.

Solución 0,1% de hidróxido de amonio.

Equipo

Espectrofotómetro UV visible

Procedimiento.

Diluir 0,2 ml de la muestra de sangre homogenizada con 25 ml de solución 0,1% de hidróxido de amonio y dividir la solución resultante en tres parte iguales A, B, y C. Saturar la solución A con monóxido de carbono mediante el burbujeo de gas a una velocidad que minimice la formación de espuma. Unos pocos minutos de burbujeo resultan suficientes. Por otra parte, la solución B se trata con oxígeno puro durante 10 minutos a los efectos de desplazar completamente el monóxido de carbono unido a la muestra.

Agregar una pequeña cantidad de ditionito a cada una de las soluciones A, B y C y también a 10 ml de la solución de amonio 0,1% y mezclar bien. Medir la absorbancia de cada solución a 540 y a 579 nm para cada solución A, B, y C. Se calcula la de relación de absorbancias a 540 a 579 para cada solución.

El porcentaje de saturación de carboxihemoglobina se calcula por la siguiente fórmula

$$\%\text{saturación} = \frac{(A_{540}/A_{579})_C - (A_{540}/A_{579})_B}{(A_{540}/A_{579})_A - (A_{540} - A_{579})_B} 100$$

Los valores normales aproximados para la relación de absorbancia son: carboxihemoglobina saturada 1,5 y hemoglobina reducida 1,1%. Considerando que el contenido de hemoglobina en sangre puede variar, el volumen de diluyente también debe ser modificado. La dilución que arroje un valor máximo de absorbancia cercano a 1 es la ideal.

4.1.1.6 Determinación cuantitativa de carboxihemoglobina mediante separación física de la carboxihemoglobina de otras hemoglobinas.

El método se basa en la alta resistencia relativa de HbCO al calor mientras que las otras formas de hemoglobina sufren coagulación. Esta técnica es simple de realizar y permite ser aplicada con resultados reproducibles si se mantienen estrictamente las condiciones indicadas: calentamiento a 55 ±0,5 °C durante 5 minutos y pH 5,05 ±0,05.

Reactivos.

1. Buffer acetato. Mezclar 1 volumen de solución 1 (300 ml de ácido acético glacial en 1 litro de agua destilada) mas 3 volúmenes de solución 2 (408 gr de acetato de sodio trihidratado disuelto en 1 litro de agua). El pH no debe variar de 5,05 ±0,05.
2. Antiespumante. Mezclar el antiespumante con agua al 1% y se agita vigorosamente con algunas perlas de vidrio.

Equipos.

Baño termostático de agua a 55 ±0,05 °C
Centrífuga a 5000 rpm. Capacidad 4 o más tubos de 10-15 ml. Especrofotómetro UV- visible.

Procedimiento.

1) 5 ml de sangre a analizar previamente homogenizada se mezclan con 15 ml de agua destilada y 1 ml de antiespumante por inversión. La mitad de esta solución es separada en un tubo, rotulada y guardada en oscuridad. La otra mitad es saturada con CO durante 30 minutos asegurándose que el volumen de la solución sanguínea no cambie.

2) De las soluciones, aquella sin tratar y la tratada con CO se toma dos alícuotas de 1,0 ml son ubicadas en 4 tubos de centrífuga conteniendo 4,0 ml de buffer acetato.

3) Después de mezclar por inmersión dos veces cada tubo, los tubos se ubican en un baño termostático de agua a 55,0 ±0,5 °C exactamente por 5 minutos.

4) Luego los tubos se enfrían en agua fría durante otros 5 minutos y centrifugados a 5000 rpm durante 5 minutos.

5) 2,0 ml de cada uno de los cuatro sobrenadantes se diluyen con 10,0 ml de agua destilada y se mezclan 2 o 3 veces por inmersión en el tubo.

6) Para la lectura se requieren tres cubetas: la cubeta 1 (blanco) emplea agua destilada, la cubeta 2 es llenada con la solución de sangre sin tratar y la cubeta 3 con solución de sangre saturada con CO. La absorbancia de las dos soluciones se leen contra agua a 570 mn y 630 nm. Luego de la lectura, la cubeta 2 es vaciada y llenada con el duplicado de la solución de sangre sin tratar. La cubeta 3 también luego de la lectura es vaciada y llenada con el duplicado de la solución de sangre saturada con CO. Se repite la lectura a 570 y 630 nm. Los cálculos se realizan mediante la siguiente relación

$$\%COHb = \frac{(A_{570}/A_{630})_{solucion\ sin\ tratar}}{(A_{570}/A_{630})_{sulucionconCO}} 100$$

7) Los valores duplicados no deben variar mas de 2 a 3 % de saturación de COHb. Con valores de saturación de COHb menores a 20% dos tipos de dificultades pueden presentarse: primero, la lectura en el espectrofotómetro de muestra sin tratar es baja e incierta. Segundo, la